

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NYELSON DA SILVA NONATO

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Muriella decolor* E SEU POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS

PALOTINA – PR

2019

NYELSON DA SILVA NONATO

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Muriella decolor* E SEU POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioenergia, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioenergia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

PALOTINA - PR

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

N812 Nonato, Nyelson da Silva
Extração do óleo da microalga *Muriella decolor* e seu potencial para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos / Nyelson da Silva Nonato – Palotina, 2019.
130f.

Orientador: Luiz Pereira Ramos
Coorientador: Marcos Lúcio Corazza
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Bioenergia.

1. *Muriella decolor*. 2. Teor lipídico. 3. Propriedades combustíveis. 4. Bioenergia. I. Ramos, Luiz Pereira. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 620.95

TERMO DE DEFESA




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOENERGIA -
40002012041P8


TERMO DE APROVAÇÃO

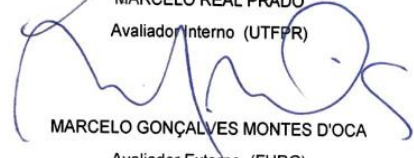
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOENERGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **NYELSON DA SILVA NONATO** intitulada: **EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Muriella decolor* E SEU POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES METILICOS DE ÁCIDOS GRAXOS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 10 de Maio de 2019.


LUIZ PEREIRA RAMOS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARCELO REAL PRADO
Avaliador Interno (UTFPR)


MARCELO GONÇALVES MONTES D'OCA
Avaliador Externo (FURG)

Dedico esse trabalho a todo meu povo Paraibano, família e amigos, por fazerem parte dos meus sonhos e compartilharem das minhas conquistas! A educação é a base de tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao universo, à criação, à vida! Muito obrigado!

A meus familiares e amigos pelo apoio, paciência e compreensão por todos os momentos de ausência durante este período.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, pelos ensinamentos, paciência, atenção e orientação para o desenvolvimento deste trabalho. Como um mineral bruto e disforme fui lapidado e hoje vejo como foi importante essa fase da minha vida sobre a sua influência. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza pela co-orientação, ensinamentos e espaço cedido no Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA) para o desenvolvimento das extrações em estado supercrítico.

Ao professor Roberto Bianchini Derner do Departamento de Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por ter fornecido a matéria-prima objeto de estudo desta pesquisa.

Aos membros da banca de defesa Prof. Dr. Marcelo Real Prado e Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca pelas contribuições para melhoria desse trabalho.

Ao meu amigo, médico, conselheiro Prof. Dr. Fausto. Sinceramente muito obrigado. Sem sua ajuda não teria chegado aqui. Em tempos difíceis nossas conversas me ajudaram a vencer os gigantes que almejavam minha paz.

Aos meus primeiros amigos em Curitiba, do Pokémon Go para a vida! Muito obrigado Alan Peterson, Ivandro Rodrigues, Karen Fujiwara, Diego Itikawa, Eduardo Ronchi, Ari Schwind e Simone Rugilo. Essa vitória dedico também a vocês! Obrigado por todos os momentos maravilhosos que passamos, desde uma simples partida a um forte abraço caloroso!

Aos colegas de trabalho do Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ), Vinícius Kothe, Tailor Peruzzolo, Débora Kochepka, Laís Pastre Dill, Rafael Duarte, Giuliana Pavaneli, Maria Juliane Suota, André Mazega, Priscila Fernandes, Priscila Dario, Gustavo Rodrigues, Fayver DeLeon, Gustavo Tanobe, Andressa e Patrícia Nadal, pelo companheirismo e ajuda nas atividades que precisei desenvolver neste laboratório, assim como nos aprendizados para a vida.

Aos colegas de trabalho do LACTA, Aline Andreza, Alexis, Ariadine, Damian e Luciana, pelas discussões científicas e cooperação durante os experimentos realizados no LACTA.

Aos colegas de trabalho do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), Priscila Dario e Beatriz, obrigado pela amizade, discussões científicas e cooperação.

A todos os amigos que fiz no departamento de Química, Engenharia Química, Geografia e Biologia da UFPR. Nesses dois anos e dois meses que se passaram vocês sempre foram presentes. Cada abraço, conversa, riso... foi revigorante! Energia fantástica! Obrigado pelo acolhimento!

Ao coordenador local do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia (PPGQ), Jonathan Dieter, e à secretária Margarida Maria da Silva, por todo auxílio durante esse período, assim como à coordenação e a todos os professores que contribuíram para minha formação durante este curso.

A todos os alunos do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da turma 2017. Muito obrigado pelo acolhimento, conversas e todo aprendizado alcançado.

A todos os amigos da cidade de Londrina-PR, primeira cidade que morei ao chegar no Paraná. Aos professores na Universidade Estadual de Londrina assim como os alunos da pós-graduação. Obrigado por todo ensinamento e carisma.

A todos os amigos da cidade de Palotina-PR, sede do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da UFPR. Aos professores e alunos da pós-graduação, obrigado!

A todos os amigos da cidade de Toledo-PR. Aos professores e alunos da pós-graduação, obrigado pela semana de aprendizado!

A todos os amigos da cidade de Ponta Grossa-PR. Aos professores e alunos da pós-graduação, obrigado!

A todos os amigos da cidade de Maringá-PR, sede da associação em rede do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. Aos professores e alunos da pós-graduação, obrigado pelo companheirismo!

A todos os amigos da cidade de Guarapuava-PR, que semana divertida e importante, muitos aprendizados! Aos professores e alunos da pós-graduação, obrigado pela atenção e ajuda.

Aos órgãos financiadores, CNPq e FINEP, e à Universidade Federal do Paraná.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento dessa dissertação.

Posso não conseguir te
presentear com brinquedos e roupas
novas, mas educação de qualidade e
comida na mesa nunca vai faltar!

Aproveite a oportunidade que
não tive e estude, vença!

(Misma da Silva Nonato)

RESUMO

A aplicação das microalgas como solução para problemas no campo da bioenergia é cada vez mais uma realidade. Isso se dá pelo grande potencial produtivo que esses microrganismos fotossintetizantes apresentam, metabolizando em curtos períodos de tempo e meios de cultivo alternativos diferentes compostos de interesse industrial: proteínas, carboidratos, pigmentos e lipídeos. No entanto, alguns gargalos na produção dessa matriz e/ou extração de seus metabolitos ainda existem e necessitam de prospecção. Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo a extração dos lipídios da microalga extremófila *Muriella decolor* utilizando um aparelho extrator Soxhlet com hexano, etanol, misturas de hexano:etanol (2:1, v/v) e clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e fluidos pressurizados (CO₂ supercrítico e propano subcrítico). Além disso, os lipídios foram esterificados e/ou transesterificados para avaliar os rendimentos teóricos de conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs), bem como seus perfis graxo e propriedades combustíveis. Das extrações convencionais de microalgas liofilizadas ou secas em estufa, a utilização de etanol anidro proporcionou o maior rendimento de óleo de microalgas (30,82 e 28,58 g, respectivamente), seguido da mistura clorofórmio:metanol (24,97 e 25,37 g). Após realizada a conversão do material graxo em FAMEs, os extratos hexânicos apresentaram as maiores taxas de conversão em FAME bruto (82,2% em massa) e os menores rendimentos de FAME (10,45% em massa). Os ácidos graxos constituintes do perfil lipídico da microalga *M. decolor* foram os ácidos oleico (C18:1; 41,7 ± 1,4 %), palmítico (C16:0; 29,3 ± 0,3 %) e linoleico (C18:2; 11,9 ± 0,2 %). Observou-se uma maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) nos extratos obtidos com etanol (46,3%) e hexano (46,5%), seguidos por ácidos graxos monoinsaturados (SFAs), que corresponderam de 30,1 a 36,6% dos ésteres presentes em todos os extratos. A utilização de fluidos pressurizados demonstrou alta seletividade extrativa para com os triacilglicerídeos presentes na microalga. O propano em condições subcríticas apresentou rendimento de extração superior (9,6 ± 0,4 g/100 g) ao alcançado com o uso de dióxido de carbono supercrítico (5,11 ± 0,02 g/100 g). Através da conversão do extrato propânico em FAMEs por diferentes metodologias foi possível constatar que, para as condições empregadas no presente trabalho, o processo de saponificação, neutralização e esterificação forneceu uma conversão de 92,7%. Já os cálculos preditivos das propriedades combustíveis dos óleos oriundos da *M. decolor* confirmaram o potencial de aplicação dessa microalga para a produção de biodiesel. Por outro lado, a biomassa obtida após os processos de extração também se revelou uma fonte em potencial de matéria-prima, com possível aplicação para a produção de ração animal e em processos baseados na conversão de proteínas, carboidratos e lipídeos complexos.

Palavras-chave: *Muriella decolor*, teor lipídico, extração convencional, fluidos pressurizados, ésteres metílicos, propriedades combustíveis, bioenergia.

ABSTRACT

The application of microalgae as a solution to problems in the field of bioenergy is increasingly becoming a reality. This is due to the productive potential that these photosynthetic microorganisms present, being able to metabolize different compounds of industrial interest (proteins, carbohydrates, pigments and lipids) in short periods of time using alternative culture media. However, some obstacles still exist in microalgae cultivation and the subsequent extraction of their metabolites, particularly in large scale operations. In this context, this work aimed to extract the lipids from the extremophilic microalgae *Muriella decolor* using a Soxhlet extractor with hexane, ethanol, hexane:ethanol (2:1, v/v) and chloroform:methanol (2:1, v/v), and pressurized fluids (supercritical CO₂ and subcritical propane). In addition, the lipids were esterified and/or transesterified to evaluate theoretical conversion yields in fatty acid methyl esters (FAMEs), as well as their fatty acid profiles and fuel properties. Based on the conventional Soxhlet extraction of freeze-dried or kiln-dried microalgae, the use of anhydrous ethanol provided the highest yield of microalgae oil (30.82 and 28.58 g, respectively), followed by the chloroform:methanol (24.97 and 25.37 g). After conversion of the microalgae oil into FAMEs, the hexanic extracts showed the highest conversion rates to crude FAME (82.2 wt%) and the lowest FAME yields (10.45 wt%). The fatty acids constituting the lipid profile of *M. decolor* were oleic (C18:1; 41.7±1.4 %), palmitic (C16:0; 29.3±0.3 %) and linoleic (C18:2; 11.9±0.2 %) acids. The highest concentrations of monounsaturated fatty acids (MUFAs) were observed in the extracts obtained with ethanol (46.3%) and hexane (46.5%), followed by saturated fatty acids (SFAs), which corresponded to 30.1-36.6 % of the esters present in all extracts. The use of pressurized fluids demonstrated high extraction selectivity for the triacylglycerides present in the microalgae oil. Propane under subcritical conditions showed an extraction yield (9.6±0.4 g/100g) higher than that achieved with the use of supercritical carbon dioxide (5.11±0.02 g/100g). By studying the conversion of the propane extract into FAMEs using different methodologies, it was possible to verify that, for the conditions employed in this work, the saponification, neutralization and esterification process provided the highest conversion of 92.7%. Predictive calculations for the fuel properties *M. decolor* FAMEs confirmed the potential application of this microalgae for the production of biodiesel. On the other hand, the biomass obtained after the extraction procedures proved to be a potential source of raw materials such as proteins, carbohydrates and complex lipids, with possible application for the production of animal feed.

Keywords: *Muriella decolor*, lipid content, conventional extraction, pressurized fluids, methyl esters, fuel properties, bioenergy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO COM FLUÍDOS PRESSURIZADOS.....	24
FIGURA 2 – ESQUEMA DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE UM TRIACILGLICERÍDEO.	33
FIGURA 3 – ESQUEMA DE HIDROESTERIFICAÇÃO DE UM TRIACILGLICERÍDEO.	34
FIGURA 4 – SECAGEM EM ESTUVA DE CIRCULAÇÃO FORÇADA DA BIOMASSA ÚMIDA DE <i>M.decolor</i>	42
FIGURA 5 – ESQUEMA DO APARATO EXPERIMENTAL PARA AS EXTRAÇÕES DE ÓLEO COM FLUIDO PRESSURIZADO.....	48
FIGURA 6 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA PRIMEIRA FRAÇÃO HEPTÂNICA DA MICROALGA <i>M. decolor</i> SECA EM LIOFILIZADOR, ANALISADA POR CROMATOGRAFIA A GÁS NA FORMA DE ÉSTERES METÍLICOS.....	58
FIGURA 7 – FRAÇÕES HEPTÂNICAS SEQUENCIAIS RESULTANTES DA REAÇÃO PROPOSTA POR MENEZES <i>et al.</i> (2013), DEMONSTRANDO A DIFERENÇA VISUAL ENTRE A COLORAÇÃO DOS EXTRATOS.....	65
FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA BIOMASSA IN NATURA E NOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS DA MICROALGA <i>M. decolor</i> , DE ACORDO COM O GRAU DE SATURAÇÃO.....	68
FIGURA 9 – CURVAS REPRESENTANDO A CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>Muriella decolor</i> UTILIZANDO PROPANO SUBCRÍTICO E CO ₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTES EXTRATORES.....	71
FIGURA 10 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR GRAU DE SATURAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS COM FLUIDOS PRESSURIZADOS DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>M. decolor</i>	74
FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DOS RENDIMENTOS MÁSSICOS OBTIDOS A PARTIR DOS EXTRATOS DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA DE <i>M. decolor</i> , EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES EXTRATORES	

E MÉTODOS DE CONVERSÃO DO EXTRATO LIPÍDICO EM ÉSTERES METÁLICOS.....	75
FIGURA 12 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H (400 MHZ, CDCl_3) DOS FAMES BRUTOS PRODUZIDOS POR PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA A PARTIR DE EXTRATO LIPÍDICO DE HEXANO USANDO SOXHLET.....	78
FIGURA 13 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H (400 MHZ, CDCl_3) DOS FAMES BRUTOS PRODUZIDOS POR PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA A PARTIR DO EXTRATO LIPÍDICO OBTIDO EM PROPANO SUBCRÍTICO.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DOS TRABALHOS EXISTENTES ACERCA DA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE MICROALGAS.	29
TABELA 2 – ESPECIFICAÇÕES DO BIODIESEL SEGUNDO A AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP).	35
TABELA 3 – CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO ENCONTRADAS POR DA CRUZ LIMA <i>et al.</i> (2018).	49
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BIOMASSA DE <i>M. decolor</i> SECA EM ESTUFA E EM LIOFILIZADOR EM RELAÇÃO À SUA MASSA ÚMIDA E MASSA SECA.	56
TABELA 5 – PERFIL DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO HEPTÂNICA CAPTURADA NA ESTERIFICAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>M. decolor</i> SECA EM LIOFILIZADOR.	59
TABELA 6 – PERFIL DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO HEPTÂNICA CAPTURADA NA ESTERIFICAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>M. decolor</i> SECA EM ESTUFA DE CIRCULAÇÃO DE AR (35°C).	60
TABELA 7 – RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) DA BIOMASSA SECA DE <i>M. decolor</i> A PARTIR DE DIFERENTES METODOLOGIAS E SOLVENTES.	63
TABELA 8 – RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) E RENDIMENTO BRUTO DE ESTERIFICAÇÃO METÍLICA (RBEM) DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DA BIOMASSA DE <i>M. decolor</i> SECA EM ESTUFA, USANDO DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.	66
TABELA 9 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS DA BIOMASSA SECA DE <i>M. decolor</i> ATRAVÉS DE DIFERENTES SOLVENTES E METODOLOGIAS.	66
TABELA 10 – CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) OBTIDO A PARTIR DAS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM FLUÍDOS PRESSURIZADOS.	70

TABELA 11 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA DE <i>M. decolor</i> OBTIDOS COM FLUIDOS PRESSURIZADOS.	72
TABELA 12 – RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) E RENDIMENTO BRUTO DE ESTERIFICAÇÃO METÍLICA (RBEM) DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA DE <i>M. decolor</i> EMPREGANDO DIFERENTES FLUIDOS PRESSURIZADOS.	73
TABELA 13 – VALORES PREDITIVOS DAS PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS DO BIODIESEL DA MICROALGA DULCÍCOLA <i>M. decolor</i> , PROVENIENTE DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS.	81
TABELA 14 – VALORES PREDITIVOS DAS PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS DO BIODIESEL DA MICROALGA DULCÍCOLA <i>M. decolor</i> , PROVENIENTE DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS EXTRAÇÕES COM FLUIDOS PRESSURIZADOS.	81
TABELA 15 – PROPRIEDADES ESTIMADAS DO BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEOS DE MICROALGAS DA CLASSE TREBOUXYOPHYCEAE. .	86
TABELA 16 – COMPOSIÇÃO MAJORITÁRIA DA BIOMASSA DESENGORDURADA DE <i>M. decolor</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADU	Níveis de insaturação das cadeias graxas, do inglês <i>Degree of fatty acid unsaturation</i>
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	do inglês <i>American Society for Testing and Materials</i>
CEN	do francês <i>Comité Européen de Normalisation</i>
CER	Taxa de extração constante, do inglês <i>Constant Extraction Rate</i>
CFPP	Ponto de entupimento do filtro a frio, do inglês <i>Cold Filter Plugging Point</i>
CN	Número de cetano, do inglês <i>cetane number</i>
DCR	Taxa controlada por difusão, do inglês <i>Diffusion Controlled Rate</i>
DUFA	Ácidos graxos di-insaturados, do inglês <i>di-unsaturated fatty acids</i>
FAME	do inglês <i>fatty acid methyl esters</i>
FER	Taxa de extração decrescente, do inglês <i>Falling Extraction Rate</i>
GC-MS	Cromatografia a gás com detecção de massas
HHV	Poder calorífico, do inglês <i>Higher Heating Value</i>
IN	Número de iodo, do inglês <i>iodine number</i>
ISO	do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
LCSF	Fator de saturação de cadeia longa, do inglês <i>Long Chain Saturated Factor</i>
LDL	Colesterol sérico
m/m	Massa/Massa
MUFA	Ácidos graxos mono-insaturados, do inglês <i>monounsaturated fatty acids</i>
NIST	do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados, do inglês <i>polyunsaturated fatty acids</i>
RBEL	Rendimento bruto do extrato lipídico
RMEM	Rendimento mássico em ésteres metílicos
RBEM	Rendimento bruto de esterificação metílica
sc-CO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
SFA	Ácidos graxos saturados, do inglês <i>saturated fatty acids</i>

SNE	Processo de saponificação, neutralização e esterificação
TAG	Triacilglicerídeos
TUFA	Ácidos graxos tri-insaturados, do inglês <i>tri-unsaturated fatty acids</i>
v/v	Volume/Volume
ρ	Viscosidade cinemática
φ	Densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 BIOENERGIA E MICROALGAS	17
3.2 <i>MURIELLA DECOLOR</i>	20
3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS DE MICROALGAS.....	22
3.4 BIOCOMBUSTÍVEIS DERIVADOS DE MICROALGAS	28
3.5 BIODIESEL DE MICROALGAS.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 MATÉRIA-PRIMA	41
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA	42
4.2.1 Análise de umidade	42
4.2.2 Análise de cinzas	43
4.2.3 Proteínas hidrossolúveis	43
4.2.4 Carboidratos totais	44
4.2.5 Lipídeos totais	45
4.3 PROCESSOS EXTRATIVOS	46
4.3.1 Extração convencional	46
4.3.2 Extração pelo método de Bligh; Dyer (1959).....	47
4.3.3 Extração em sistema de fluxo contínuo em solvente pressurizado	47
4.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS	50
4.4.1 Rendimento Bruto de Esterificação Metílica	50
4.4.2 Teor de ésteres totais.....	51
4.4.3 Perfil e teor de ésteres metílicos de ácidos graxos	52
4.5 PREVISÃO DE PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS EM ÉSTERES METÍLICOS.....	53
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 CARACTERIZAÇÃO	56

5.1.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	56
5.1.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA	57
5.2 EXTRAÇÃO EM SOXHLET	62
5.2.1 Rendimento bruto de extrato lipídico	62
5.2.2 Perfil Graxo e Rendimento Bruto de Esterificação Metílica (RBEM)	64
5.3 EXTRAÇÕES EM SISTEMA COM FLUIDO PRESSURIZADO	69
5.3.1 Rendimentos e cinética de extração	69
5.3.2 Perfil Graxo e Rendimento Bruto de Esterificação Metílica (RBEM)	71
5.4 RENDIMENTO MÁSSICO EM ÉSTERES METÁLICOS	74
5.5 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS DOS ÉSTERES	79
5.6 BIOMASSA RESIDUAL	86
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92
 APÊNDICE	 117

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da revolução industrial um novo momento foi desencadeado na história do planeta Terra. Com o desenvolvimento de inúmeros processos baseados na combustão ao longo de várias décadas, o aceleração brusco do efeito estufa foi intensificado. Grandes quantidades de gases que contribuem para o efeito estufa acumulam continuamente na atmosfera principalmente pelo fato do uso constante de derivados do petróleo como fonte de energia. Segundo dados de 2010, 71% desses gases são gerados pelo ciclo energético convencional (produção e consumo), tendo como principal responsável o setor de transportes (WILBANKS; FERNANDEZ, 2014). Além disso, projeções atuais sugerem que o ápice do consumo de combustíveis fósseis se dará no ano de 2025, segundo relatório da Bloomberg New Energy Finance (MACDONALD, 2016). A partir dos dados atuais de produção em nível global, alguns pesquisadores já projetam o pico de consumo do petróleo para o ano de 2020, portanto, cinco anos a menos do prazo inicialmente previsto (ORTIZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

Um aumento gradual de cerca de 2 ppm por ano na concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO₂) vem sendo percebido desde o início de seu monitoramento, que se deu a partir de 1970 (SINGH; AHLUWALIA, 2013; CHEAH *et al.* 2015). Discussões acerca da redução na emissão de CO₂ atmosférico são constantes e trazem à tona a busca por fontes energéticas que possam ser repostas em pouco tempo (renováveis) e que sejam menos poluentes. Nesse contexto, o desenvolvimento de tecnologias bioenergéticas é de extrema importância para a descarbonização do planeta, ou pelo menos para a redução das emissões de carbono devidas diretamente ao consumo de combustíveis derivados do petróleo.

Os biocombustíveis líquidos emergem como solução iminente para o problema e por isso vêm sendo inseridos na matriz energética brasileira ao longo das últimas décadas. Além de produzirem baixos níveis de CO₂ na atmosfera quando comparados aos derivados do petróleo, os biocombustíveis líquidos são uma opção estratégica para a segurança energética de economias emergentes. O etanol e o biodiesel (ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos) são os principais biocombustíveis líquidos presentes na matriz energética brasileira, sendo estes majoritariamente produzidos a partir da cana-de-açúcar e da soja (matrizes vegetais) empregando diferentes rotas para sua produção, respectivamente. Juntamente com o Brasil, os Estados Unidos da América e a União Europeia também figuram dentre os maiores produtores de biocombustíveis líquidos do mundo (BALLESTEROS; MANZANARES, 2019).

A diversificação de matrizes para produção de biocombustíveis é de suma importância devido a questões econômicas e ambientais, nesse caso associadas à contribuição que possam oferecer no sequestro de CO₂ atmosférico. Neste contexto, os microrganismos, especificamente as microalgas, vêm ganhando destaque devido ao seu alto potencial produtivo, utilizando-se da energia solar, gás carbônico e nutrientes básicos para o seu crescimento. O termo microalga compreende vários microrganismos fotossintetizantes primários de diferentes domínios taxonômicos que formam a base da cadeia trófica aquática e participam efetivamente no sequestro de CO₂ atmosférico (SHUKLA *et al.* 2017; HASAN; VOGT, 2018). Algumas espécies acumulam quantidades expressivas de lipídeos, que podem chegar até cerca de 80% de sua massa seca dependendo das condições de cultivo (GRIFFITHS; HARRISON, 2009), extrapolando em muito os 20% de óleo encontrados na soja (SHAHIDI, F. 2005). As microalgas apresentam produtividade e crescimento

exponencial elevados, não necessitam de água potável ou de grandes áreas para o cultivo e, quando comparadas às oleaginosas, apresentam uma eficiência de produção muito superior (GRIFFITHS; HARRISON, 2009; MATA *et al.* 2010; SU *et al.* 2017).

A partir da produção de diferentes metabólitos, além de lipídeos na forma de derivados de ácidos graxos, as microalgas podem contribuir para o desenvolvimento de projetos de biorrefinaria. Por exemplo, a partir da proteína existente pode-se produzir ração animal (BECKER, 2007; LEI, 2018), dos carboidratos estruturais (celulose) e/ou de reserva (amido) o etanol (RIZZA *et al.*, 2017), dos pigmentos (ficobilinas, clorofilas e carotenoides) e outros metabólitos secundários (vitaminas e antioxidantes) aditivos para as indústrias alimentícia e farmacêutica (D'ALESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016; SASSI *et al.*, 2019) e, por fim, dos lipídeos a produção de biodiesel e outros insumos oriundos da indústria oleoquímica (NEGRELL *et al.*, 2017; CALIXTO *et al.*, 2018). Assim, o aproveitamento integral da biomassa de microalgas é de suma importância para tornar rentável a sua produção em larga escala (WIJFFELS *et al.*, 2010; ZHU, 2015).

A prospecção por espécies potencialmente produtoras de metabólitos de interesse, assim como de métodos mais eficientes de cultivo (lagoa de circulação continua ou fotobiorreatores, meios e condições de cultivo), colheita (filtração, centrifugação, sedimentação ou floculação), secagem (secagem térmica ou desidratação mecânica) e extração (ação mecânica e não mecânica), são os pilares para o desenvolvimento industrial de biorrefinarias baseadas no uso de biomassa de microalgas (DELATTRE *et al.*, 2016; RIZWAN *et al.*, 2018).

No mundo todo, pesquisas relacionadas à utilização das microalgas com finalidades biotecnológicas e de bioenergia se expandem de forma crescente.

Assim, mesmo que de forma minoritária quando comparada aos processos já existentes, as microalgas vêm ganhando espaço rapidamente em vários setores industriais. O seu cultivo em escala industrial já é uma realidade, mas barreiras relacionadas à escala de produção e à extração de seus metabólitos de interesse ainda representam grandes desafios. Uma das dificuldades envolvidas é maximizar de forma econômica as metodologias de extração em escala industrial, minimizando assim os custos de produção (LEE *et al.*, 2012). Isso pode ser alcançado pela utilização de mais de um processo extrativo ou de processos híbridos capazes de extrair quantidades elevadas de lipídeos neutros, mais especificamente, ácidos graxos e triacilglicerídeos (HALIM *et al.*, 2012).

O presente trabalho teve por objetivo investigar a influência de dois métodos de secagem (liofilização e estufa) e de metodologias de extração convencionais (com solventes orgânicos em Soxhlet ou assistidas por ultrassom) e inovadoras (sistemas pressurizados) sobre o rendimento mássico em óleo da clorofícea *Muriella decolor*, determinar o seu perfil de ácidos graxos e avaliar as propriedades combustíveis desse perfil para aplicação como biodiesel, de forma a demonstrar a viabilidade dessa como matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo para maximizar a extração do óleo da microalga *Muriella decolor*, estudar a aplicação de seu extrato lipídico para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos e caracterizar a composição centesimal da biomassa residual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização física e química da biomassa da microalga seca em liofilizador e em estufa com circulação de ar;
- Comparar os rendimentos e os perfis de extração convencional em Soxhlet empregando diferentes composições de solventes (etanol, hexano, clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e hexano:etanol (2:1, v/v);
- Investigar a eficiência e a seletividade da extração do óleo da microalga empregando solventes pressurizados;
- Comparar o rendimento das extrações realizadas em sistema convencional e com solvente pressurizado (Propano e CO₂);
- Estimar as propriedades combustíveis dos ésteres metílicos derivados de ácidos graxos presentes no óleo da microalga (biodiesel);
- Quantificar os níveis de proteínas e carboidratos da biomassa residual das extrações e traçar possíveis aplicações para a mesma.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bioenergia e Microalgas

Ao longo da evolução humana, o uso da energia vem se transformando constantemente, desde o domínio do fogo em tempos primitivos de coleta e caça ao uso de petróleo para suprimento de energia e insumos para a indústria de transformação. Até meados do século XVIII o calor e a luz eram gerados basicamente a partir da queima da madeira e óleos vegetais ou animais. As fontes utilizadas na geração da energia se transformaram ao longo do tempo e o avanço científico gerou inovações como as máquinas movidas a vapor e a queima de carvão em caldeiras. Com a virada do século XIX a produção industrial alavancou um melhor entendimento sobre geração, armazenamento e aplicação da energia elétrica e do petróleo, que representa uma matriz fóssil não renovável (GUO *et al.*, 2015).

Os avanços tecnológicos da época marcaram o início de uma transformação progressista, mas o custo de toda inovação associada à matriz do petróleo, seja na geração de energia ou nas mais diversas aplicações industriais, foi a geração de poluentes em grande quantidade e, entre esses, o dióxido de carbono – CO_2 – é o de maior emissão e concentração na atmosfera. Desde o período pré-industrial tais níveis têm sido cada vez mais crescentes e, desde a metade do século XX ao ano 2000 foi contabilizado um aumento de 43% na concentração do CO_2 na atmosfera (STOCKER *et al.*, 2013), gerando fenômenos como o aquecimento global e a acidificação dos oceanos (RIES, 2011). Como contribuição à minimização da geração de poluentes e maximização da produção de energia, a Bioenergia – energia de biomassa – surge no cenário internacional, visando modificar a produção e o consumo de energia em direção ao uso de fontes renováveis cuja produção de

poluentes fosse minoritária, de preferência cíclica em relação à composição da atmosfera (FISCHER; SCHRATTENHOLZER, 2001).

Entre as principais fontes de biomassa para a produção de bioenergia encontram-se produtos agrícolas, florestais e agroindustriais (GUO *et al.*, 2015). Uma das principais estratégias para o aproveitamento energético dessas matrizes é a produção de biocombustíveis, como etanol de amido (HAN *et al.*, 2019), etanol celulósico (SCHNEIDER *et al.*, 2020; AYODELE *et al.*, 2020), biodiesel (HARIPRASATH *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019), biogás por fermentação anaeróbica (NING *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020), bioóleo, biocarvão e gases de síntese por processos de degradação térmica como pirólise (FERMOSO *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2018; VAMVUKA *et al.*, 2019; HONG *et al.*, 2020). Quando comparado às fontes fósseis, os biocombustíveis representam um tipo de energia limpa, renovável e de baixo custo, contribuindo na reparação dos danos já causados ao meio ambiente. Mesmo com todo esse potencial, algumas hipóteses estão sendo levantadas acerca da real eficiência da bioenergia em relação ao meio ambiente, assim como a viabilidade de sua produção e utilização. Atrelado à produção agrícola temos o desmatamento para a ampliação do cultivo de monoculturas, gerando um grande desequilíbrio ecológico, além da perda de variabilidade genética e de habitat para espécies locais, vegetais e animais (NÚÑEZ-REGUEIRO *et al.*, 2019). Outro ponto relevante a ser discutido é a competição entre a produção agrícola para alimentação humana e para a produção de bioenergia. Em ambos os casos, há a demanda por grande quantidade de água para sustentar a produção, combustível fóssil para transporte e áreas para cultivo, processamento e armazenamento do material (VERDADE *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017; STOKSTAD, 2019). A partir do aumento da demanda por energia renovável, a busca por novas fontes tem sido

intensificada e as microalgas vêm ganhando espaço, apesar de ainda existirem alguns gargalos tecnológicos a serem superados (RAHEEM *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2020).

As microalgas são microrganismos eucariontes ou procariontes fotossintetizantes que, a partir de seu metabolismo, produzem uma grande variedade de compostos (carboidratos, proteínas, lipídeos, hidrocarbonetos, pigmentos carotenoides, clorofilas, etc.) com possíveis aplicações biotecnológicas nos mais diversos segmentos industriais (HOYER *et al.*, 2018; SASSI *et al.*, 2019). As microalgas não dependem de terras agricultáveis, água doce ou estações específicas do ano para serem produzidas, diferentemente das cultivares atuais (soja, milho, canola, cana-de-açúcar, etc.). Tais microrganismos necessitam apenas de luz solar, CO₂, nutrientes e alguns sais para se desenvolverem (CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010; LOZANO-GARCIA *et al.*, 2019). Algumas espécies têm o potencial de remediar efluentes por metabolizar sólidos dissolvidos e convertê-los a determinados metabólitos de interesse, como lipídeos para o biodiesel e amido para o etanol (CALIXTO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017; SASSI *et al.*, 2018; CHEN; WANG, 2020; LEONG; CHANG, 2020). Entre as espécies usualmente estudadas podem ser destacadas as clorofíceas do gênero *Chlorella* (PHUKAN *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2015; SOUOD *et al.*, 2017; SKORUPSKAITE *et al.*, 2019), *Nannochloropsis* (MOAZAMI *et al.*, 2012; BAUMGARDT *et al.*, 2016; CHIA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019), *Scenedesmus* (MCGINN *et al.*, 2012; ASHOKKUMAR *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2019; YE *et al.*, 2020) e *Haematococcus* (OROSA *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2016; KWAN *et al.* 2018; SAMORÌ *et al.*, 2019), e as cianobactérias do gênero *Arthrospira* (LECINA *et al.*, 2017; MONTALVO *et al.*, 2019; DEVI *et al.*, 2020), dentre outras.

3.2 *Muriella decolor*

Pertencente à classe Trebouxiophyceae e à família Chorellaceae, o gênero *Muriella* é representado por 4 espécies: *M. australis*, *M. magna*, *M. terrestres* e *M. decolor* (FRIEDL; RYBALKA, 2012). Em estudos taxonômicos com *M. decolor* coletada em regiões polares, Czerwik-Marcinkowska *et al.* (2015) observaram que sua morfologia é caracterizada por apresentar células únicas, esféricas ou elipsoides com parede celular fina, que sofre engrossamento a partir da maturação da célula. Sua distribuição é bem diversa no globo, tendo sido catalogada no Ártico (PATOVA *et al.*, 2015), na Eslováquia e na Suíça (ETTL; GÄRTNER, 2014), no México (FLECHTNER *et al.*, 1998) e nos Estados Unidos da América (JOHANSEN *et al.*, 2007). Essa microalga habita os mais diversos locais, como rochas, cavernas, solos diversos e áreas com e sem gelo, sendo uma das primeiras a colonizar o ambiente (CZERWIK-MARCINKOWSKA *et al.*, 2015).

Informações acerca da parede celular da *M. decolor* são inexistentes. No entanto, a literatura reporta apenas que as microalgas da família Chorellaceae apresentam uma parede celular dupla, coberta por uma camada externa única ou trilaminada, composta por polissacarídeos do tipo β -(1 \rightarrow 3)-xilanas e/ou β -(1 \rightarrow 4)-mananas, quitina e glucosaminoglucanas acetiladas (BAUDELET *et al.*, 2017.).

No que diz respeito à produção de metabólitos de interesse industrial, Del Río *et al.* (2015) avaliaram a acumulação lipídica em dez espécies de microalgas de diferentes gêneros sob regime de nitrato de sódio (NaNO₃) no meio de cultivo e a microalga *M. decolor* esteve entre as espécies estudadas (*Chlorella fusca*, *Chlorococcum oleofaciens*, *Monoraphidium braunii*, *Muriella aurantiaca*, *Muriellopsis* sp., *Neochloris oleoabundans*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus almeriensis* e *Tetraselmis suecica*). Esse foi o primeiro trabalho a relatar dados sobre

o cultivo e o conteúdo graxo dessa microalga. A quantidade de NaNO_3 adicionada ao meio de cultivo determinou uma variação no percentual de ácidos graxos presentes na biomassa. Os maiores níveis de nitrato (20 mM de NaNO_3) acarretaram em uma maior concentração ($2,30 \pm 0,06$ g/L) e produtividade ($0,69 \pm 0,03$ g/L) de biomassa, em contrapartida a uma menor produtividade ($66,20 \pm 3,80$ g/L) e percentual de ácidos graxos ($9,60 \pm 0,60$ g/L) na biomassa. Já em relação ao perfil graxo, percebeu-se que o agregado de ácido palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1) representou 67,4% dos ácidos graxos totais nas culturas com limitação de nitrato, enquanto que para células cultivadas em meio controle contendo nitrato os ácidos linolênico (C18:3, 41,2%) e hexadecatetraenoico (C16:4, 15,9%) foram os que se apresentaram em maiores níveis.

Além das informações acerca da composição lipídica, a literatura reporta apenas um trabalho sobre os pigmentos carotenoides oriundos do metabolismo celular de *M. decolor*. Cultivada em meio sintético modificado contendo 4 mM K_2HPO_4 com suplementação de nitrogênio, Del Campo *et al.* (2000) identificaram uma produção de $9,60 \pm 1,1$ g L^{-1} em biomassas de *M. decolor*, cujo perfil de carotenoides era composto por $1,5 \pm 0,1$ mg L^{-1} de cantaxantina, $0,6 \pm 0,1$ mg L^{-1} de β -caroteno e $5,0 \pm 0,3$ mg L^{-1} de luteína.

O terceiro trabalho existente há relatar informações acerca da microalga *M. decolor* foi desenvolvido por Gruber-Brunhumer *et al.* (2019), cultivando diferentes cepas de microalgas (*Chlamydomonas moewusii*, *Chlorella emersonii*, *C. vulgaris*, *Acutodesmus obliquus*, *Eustigmatos magnus*, *Pseudomuriella aurantiaca*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella mirabilis*, *Muriella cf. decolor* e *Chlorella vulgaris*) em meio sintético BBM foi possível observar através de medidas de peso seco uma produtividade de 65 mg L^{-1} dia^{-1} no cultivo de *M. decolor* em Erlenmeyer de 2 litros.

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS DE MICROALGAS

O termo extração caracteriza a retirada de um material de interesse a partir de uma determinada matriz. Os principais métodos envolvidos nesse procedimento incluem extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração com fluido supercrítico (QUEIROZ *et al.* 2001).

Dentre os métodos de extração existentes, a utilização de solventes orgânicos (líquido-líquido) tem se destacado. Usualmente utiliza-se um ou mais solventes, de acordo com o material a ser extraído, empregando sistemas convencionais, extração exaustiva sob refluxo contínuo (Soxhlet) ou agitação mecânica e de métodos inovadores, como a utilização de fluidos pressurizados. Solventes polares (metanol, etanol, água, etc.) e apolares (hexano, pentano, etc.) são normalmente utilizados para assegurar uma extração completa do material lipídico das microalgas (HALIM *et al.*, 2012).

Folch *et al.* (1956) desenvolveram uma técnica utilizando clorofórmio:metanol (2:1, v/v) para extração dos lipídeos totais de materiais oleaginosos, empregando uma solução salina para melhorar a separação de fases (aquosa e lipídica) de forma que os lipídeos fossem carregados para a fase de clorofórmica. Alguns anos depois, Bligh e Dyer (1959) propuseram uma adaptação desse método baseada na inserção de água na mistura de solventes, em uma relação volumétrica clorofórmio:metanol:água de 1:2:0,8 ou 2:2:1,8. A utilização deste sistema trifásico contribuiu diretamente a uma melhor extração de todo o conteúdo lipídico (apolar e neutro) das microalgas, facilitando a separação de fases e o carregamento da fração pouco polar para a fase clorofórmica e o conteúdo polar para a fase metanol/água. Apesar da alta eficiência de extração, esses dois métodos

utilizam solventes clorados e não são seletivos, extraindo outros constituintes celulares como pigmentos e hidrocarbonetos, quando presentes.

Visando encontrar o melhor método para extração do material graxo das microalgas *Scenedesmus* sp., *Hindakia tetrachotoma* e *Micractinium* sp. Onay *et al.* (2016) utilizaram-se de três metodologias convencionais, Soxhlet, Bligh e Dyer e Folch, podendo observar que as extrações realizadas em Soxhlet e pelo método de Bligh e Dyer foram as que apresentaram menores variações em relação ao conteúdo lipídico (%), independentemente das espécies estudadas.

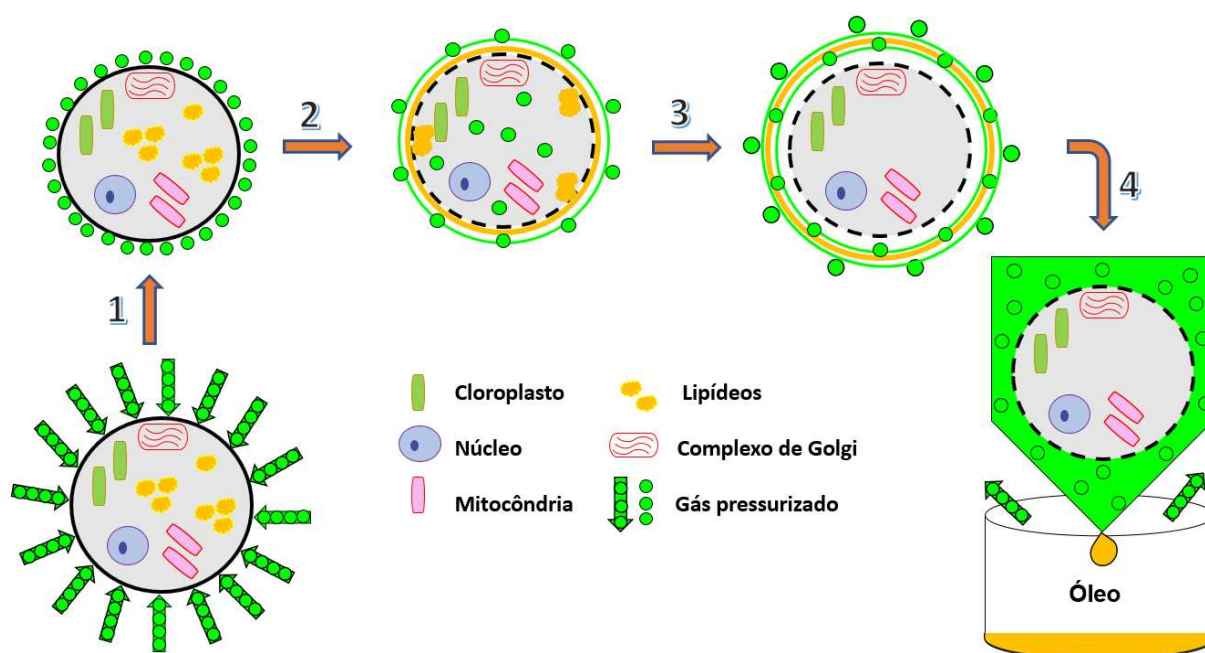
No sistema Soxhlet, a extração é realizada de forma exaustiva mediante etapas sequenciais e contínuas de evaporação, condensação e sifonação do solvente. Dessa forma, a limitação à transferência de massas é reduzida, bem como o consumo de solvente para a extração (BAHADAR; KHAN, 2013; HALIM *et al.*, 2012). No entanto, a utilização de temperaturas mais altas para evaporação do solvente gera um consumo contínuo de energia, bem como ao estresse térmico do extrato que se concentra no balão de evaporação, levando eventualmente a alterações químicas como a oxidação de componentes termolábeis. Outros pontos negativos seriam o consumo contínuo de solventes e a utilização de solventes tóxicos como o clorofórmio para extração dos metabólitos de interesse.

Baumgardt *et al.* (2016) avaliaram o perfil graxo dos extratos e o rendimento de extrações em Soxhlet da microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, empregando etanol, hexano e a mistura de solventes clorofórmio:metanol na proporção 2:1 (v/v). Os resultados obtidos indicaram o etanol anidro como melhor solvente para esse sistema de extração por apresentar um rendimento em massa de óleo superior aos outros solventes utilizados (11,3% de extrato bruto). A vantagem da utilização do etanol em relação à sua mistura com clorofórmio também se deu

pelo fato de ser um solvente menos tóxico, de origem renovável e com baixo valor de mercado.

A utilização de fluidos pressurizados em condições sub ou supercríticas ofereceu grandes avanços às técnicas de extração de compostos orgânicos, assim como na aplicação desses extratos em produtos de interesse comercial, porque altas seletividades podem ser obtidas sem maiores influências sobre a composição e a integridade química dos materiais extraídos (MATTJE *et al.*, 2019; VILLANUEVA-BERMEJO *et al.*, 2019). A FIGURA 1 oferece uma representação de como se dá a extração dos metabólitos de interesse mediante a utilização de fluidos pressurizados.

FIGURA 1 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO COM FLUÍDOS PRESSURIZADOS.



FONTE: O autor (2019).

Inicialmente, as moléculas do fluido são adsorvidas na superfície da biomassa por interações químicas e físicas, acarretando a dilatação das estruturas que compõem a parede celular das células, reduzindo a resistência à transferência

de massas e facilitando a extração do material de interesse. Na fase 2 os compostos de interesse migram a partir do gradiente de concentração do solvente utilizado, sendo, portanto, carregados para fora das células através do processo de difusão e formando uma película líquida sobre as partículas. Na fase 3, o extrato é transportado para o fluido extrator, de onde poderá ser recuperado a posteriori. A fase 4 corresponde ao final do processo extrativo, onde ocorre a difusão e dessorção do extrato até que este esteja totalmente contido no fluido pressurizado (BRUNNER, 2013). A mistura soluto/solvente é coletada a partir da abertura da válvula de purga do extrator. Quando a extração é realizada sem auxílio de cossolvente, apenas o extrato fica contido no recipiente de coleta, já que o solvente estará na fase gasosa, podendo ser recuperado para posterior reutilização em novas extrações.

Atualmente, a extração em fluido pressurizados é uma metodologia que está sendo muito explorada, pois além de inovadora é uma técnica capaz de gerar ótimos resultados de extração quando comparada aos métodos clássicos (BAUMGARDT *et al.*, 2016; MORIOKA *et al.*, 2014). Como pontos negativos tem-se o custo do equipamento e o alto custo de manutenção, que têm que ser compensados pela qualidade e valor agregado dos produtos de extração.

Crampon *et al.* (2017) realizaram a extração de lipídeos neutros e antioxidantes da microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) utilizando CO₂ supercrítico em diferentes condições experimentais. Foi constatado que a pressão é o parâmetro mais influente sobre os rendimentos e a cinética de extração. Já a temperatura é o parâmetro que influenciou de forma mais significativa o poder antioxidante do extrato. Quanto maior a temperatura, maior o teor de antioxidantes isolados da biomassa de microalgas.

Os métodos de extração podem ser assistidos por métodos físicos de ruptura celular. A partir da complexa estrutura da parede celular das clorofíceas faz-se necessário a utilização de métodos de intensificação que propiciem uma desestabilização dessas estruturas, conferindo assim acesso ao material citoplasmático de interesse.

Os métodos de ruptura celular podem ser categorizados de duas formas: por ação mecânica (homogeneizadores, moinhos, ultrassom e autoclave) ou ação não-mecânica (congelamento, choque osmótico, hidrólise ácida, básica e reações enzimáticas). É interessante ressaltar que além de extrair metabólitos os solventes orgânicos também causam danos à parede celular, sendo classificados como métodos de ação não-mecânica.

Entre os métodos físicos de ruptura da parede celular mais utilizados podem ser destacados a aplicação de ultrassom (WANG; YUAN, 2016; LECINA *et al.*, 2017; SKORUPSKAITE *et al.*, 2019) e o uso de irradiação por micro-ondas (GÜNERKEN *et al.*, 2015; CHEE LOONG; IDRIS, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Quando aplicados sobre a matriz de interesse, tais métodos desestabilizam a parede celular, expondo assim o conteúdo intracelular de forma mais eficaz.

O ultrassom (sonicação) age através da transmissão de ondas sonoras (vibrações mecânicas) com frequência de no mínimo 20 kHz e no máximo a 1 MHz sobre um determinado material, independentemente do estado físico da matéria. A dissipação das ondas sonoras no meio cria uma série de microbolhas de cavitação oscilando de forma regular e a partir desse processo contínuo, as forças de cisalhamento geradas são capazes de desarranjar a estrutura da parede celular (CHISTI; MOO-YOUNG, 1986; WANG; WELLER, 2006). Além de ser um tratamento barato e de fácil operação, o ultrassom apresenta como vantagens o aumento do

rendimento e da cinética extração e a redução da temperatura operacional, podendo ser realizada com qualquer solvente de interesse (WANG; WELLER, 2006).

O princípio básico de funcionamento do micro-ondas se deve a um processo de ressonância. As micro-ondas atuam em moléculas polares (de constante dielétrica alta) que absorvem eficientemente a energia das ondas eletromagnéticas (300 MHz - 300 GHz). A absorção de energia pelas moléculas faz com que elas se agitem e se friccionem liberando parte dessa energia na forma de calor (GÜNERKEN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019). A ruptura celular ocorre devido ao aumento na pressão interna da célula, que é ocasionado pela expansão da água ao atingir o seu ponto de ebulição na presença das micro-ondas (CHUANBIN *et al.*, 1998). Como vantagens tem-se um aumento na cinética de extração e redução no uso de solvente, conferindo melhores resultados (WANG; WELLER, 2006).

Visando maiores eficiências de extração dos produtos de interesse, várias pesquisas vêm associando métodos de rompimento da parede celular com os de extração de material intracelular (SHOW *et al.*, 2015; TAPARIA *et al.*, 2016). No entanto, essa estratégia depende das características da parede celular, dos solventes utilizados e dos metabólitos de interesse a serem extraídos, dentre outros (ZHANG *et al.*, 2019). A extração utilizando fluidos pressurizados tem grande potencial devido a sua capacidade única de romper as células e extrair de forma seletiva os componentes lipídicos. Dependendo das condições a que a biomassa é submetida, a parede celular tem sua porosidade aumentada, gerando vários níveis de ruptura celular (LIN *et al.*, 1992) que facilitam a extração de compostos.

Howlader *et al.* (2019) utilizaram essa técnica para melhorar os rendimentos de extração lipídica da biomassa úmida de *Rhodotorula glutinis*. A aplicação de CO₂ pressurizado a 23,5 ° C e 40 bar por 360 min resultou em um aumento de 12% no

rendimento e sua eficácia na ruptura celular foi demonstrada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Um ponto importante a ser discutido é a dificuldade de escalonamento e de reprodutibilidade dos métodos extrativos ao nível industrial e o impacto ambiental gerado pelo processo de extração, que deve ser avaliado através de um estudo aprofundado de seu ciclo de vida e dos custos a ele atrelados. Assim, apesar da potencialidade dos métodos, esses foram aplicados apenas em experimentos de bancada laboratorial.

3.4 BIOCOMBUSTÍVEIS DERIVADOS DE MICROALGAS

Os biocombustíveis líquidos são caracterizados como combustíveis oriundos de fontes renováveis (biomassa vegetal) que podem substituir parcial ou totalmente os combustíveis derivados de fontes não-renováveis (petróleo e gás natural) em motores a combustão (setor de transporte) ou quaisquer outros modelos de geração de energia (WU *et al.*, 2010).

Por motivos ambientais, a busca por alternativas para a produção de biocombustíveis tem sido intensificada e a utilização das microalgas para esse fim tem sido de ótima repercussão, pois a partir dessas pode-se produzir biocombustíveis com um retorno energético bem mais elevado do que os derivados de outros tipos de matérias-primas. Porém, suas vantagens são parcialmente contrapostas pelo alto custo de produção em larga escala, principalmente para o desenvolvimento de biocombustíveis como o biodiesel (CHISTI, 2007), dificuldades de extração dos componentes de interesse e o elevado custo ambiental no caso do uso de solventes tóxicos para o processo de extração.

A indústria de energias renováveis vem investigando e investindo fortemente na produção de biocombustíveis a partir de microalgas e essa iniciativa vem ganhando espaço no cenário mundial. Inclusive, alguns biocombustíveis de microalgas já foram produzidos e testados, como biodiesel (CHEE LOONG; IDRIS, 2014; SITEPU *et al.*, 2018), biogás (PASSOS *et al.*, 2013), bioquerosene (CHIARAMONTI *et al.*, 2014) e etanol (MÖLLERS *et al.*, 2014). A TABELA 1 fornece um levantamento sobre os estudos realizados até o momento nessa linha de pesquisa e desenvolvimento.

TABELA 1 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DOS TRABALHOS EXISTENTES ACERCA DA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE MICROALGAS.

Tipo	Origem	Espécie	Referência
Biodiesel	Lipídeos	<i>Tribonema minus</i>	Wang <i>et al.</i> (2013)
		<i>Nannochloropsis</i> sp. e <i>Tetraselmis</i> sp.	Chee Loong; Idris (2014)
		<i>Nannochloropsis</i> sp.	Chee Loong; Idris (2017)
		<i>Chloroparva pannonica</i>	Sitepu <i>et al.</i> (2018)
		<i>Chlorella</i> sp.	Yodsuwan <i>et al.</i> (2018)
		<i>Spirulina platensis</i>	Raoufi; Mousavi Gargari (2018)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Fang <i>et al.</i> (2018)
		<i>Scenedesmus</i> sp.	Sivaramakrishnan; Incharoensakdi (2018)
		<i>Chlorella prototecóides</i>	Uludamar (2018)
		<i>Leptolyngbya</i> sp. e <i>Chlorella vulgaris</i>	Narendrakumar, G. <i>et al.</i> (2018)
		<i>Desmodesmus</i> sp. e <i>Heterochlorella</i> sp.	Abinandan <i>et al.</i> (2019)
		<i>Scenedesmus</i> sp.	Shomal <i>et al.</i> (2019)
		<i>Chlorella</i> sp.	Al-Ameri; Al-Zuhair (2019)
		<i>Spirulina platensis</i>	Rajak <i>et al.</i> (2019)
		<i>Scenedesmus</i> sp.	Tripathi <i>et al.</i> (2019)
		<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Cancela <i>et al.</i> (2019)

TABELA 1 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DOS TRABALHOS EXISTENTES ACERCA DA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE MICROALGAS.

(continuação)

Tipo	Origem	Espécie	Referência
Bioetanol	Carboidratos	<i>Chlorella vulgaris</i>	Ho <i>et al.</i> (2013)
		<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Lee <i>et al.</i> (2013)
		<i>Synechococcus</i> sp.	Möllers <i>et al.</i> (2014)
		<i>Scenedesmus bijugatus</i>	Ashokkumar <i>et al.</i> (2015)
		<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Varela <i>et al.</i> (2016)
		<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Chng <i>et al.</i> (2016)
		<i>Nannochloropsis oculata</i>	Reyimu; Özçimen (2017)
		<i>Tetraselmis suecica</i>	
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Souod <i>et al.</i> (2017)
		<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Onay (2018b)
		<i>Chlorella vulgaris</i> ,	Juliarnita <i>et al.</i> (2018)
		<i>Scenedesmus obliquus</i> e	
		<i>Chlorococcum</i> sp.	
		<i>Hindakia tetrachotoma</i>	Onay (2019)
		<i>Chlamydomonas</i>	El-Dalatony <i>et al.</i> (2019)
		<i>mexicana</i>	
		<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Lee <i>et al.</i> (2019a)
Biobutanol	Carboidratos	<i>Scenedesmus</i> sp.,	Castro <i>et al.</i> (2015)
		<i>Ankistrodesmus</i> sp.,	
		<i>Chlorella</i> sp. e	
		<i>Micromonas</i> sp.	
		<i>Chlamydomonas</i> sp. e	Wang <i>et al.</i> (2016)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Gás de síntese		<i>Chlorella vulgaris</i>	Gao <i>et al.</i> (2016)
		<i>Neochloris aquatica</i>	Wang <i>et al.</i> (2017)
		<i>Chlorella</i> sp.	Onay (2018a)
		<i>Synechococcus elongates</i>	Wagner <i>et al.</i> (2019)
		e <i>Synechocystis</i> sp.	
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Figueira <i>et al.</i> (2015)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Raheem <i>et al.</i> (2015)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Aziz (2016)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Bach <i>et al.</i> (2017)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Aziz; Zaini (2017)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Liu <i>et al.</i> (2018a)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Liu <i>et al.</i> (2018b)

TABELA 1 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DOS TRABALHOS EXISTENTES ACERCA DA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE MICROALGAS.

(continuação)

Tipo	Origem	Espécie	Referência
Bio-óleo		<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Adamczyk; Sajdak (2018)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Liu <i>et al.</i> (2019)
		<i>Chlorella</i> sp.	Samiee-Zafarghandi <i>et al.</i> (2019)
		<i>Chlorella protothecoides</i>	Miao; Wu (2004)
		<i>Nannochloropsis</i> sp.	Pan <i>et al.</i> (2010)
		<i>Microcystis</i> sp.	Hu <i>et al.</i> (2013)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Belotti <i>et al.</i> (2014)
		<i>Chlorella</i> sp., <i>Spirulina</i> sp. e <i>Porphyra</i> sp.	Hong <i>et al.</i> (2017)
		<i>Micractinium conductrix</i>	Wang <i>et al.</i> (2018)
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Andrade <i>et al.</i> (2018)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Oliveira; Ferraz (2018)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Zainan <i>et al.</i> (2018)
		<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Adamczyk; Sajdak (2018)

FONTE: O autor (2019).

3.5 BIODIESEL DE MICROALGAS

O biodiesel é um combustível renovável constituído quimicamente por uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos provenientes de lipídeos derivados de óleos e gorduras animais e vegetais.

Os lipídeos dividem-se majoritariamente em duas classes: neutros e polares. Os polares são mais complexos, têm função estrutural e dividem em fosfolipídeos, glicolipídeos, ceramidas, cerebrosídeos e gangliosídeos. Já os neutros, mais acessíveis e passivos de extração por serem produtos de reserva, são divididos em triacilglicerídeos, carotenoides, esteróis e alguns hidrocarbonetos. A extratibilidade de cada um desses componentes lipídicos está diretamente relacionada à biodisponibilidade e solubilidade nos solventes utilizados para extração (BASOVA, 2005; VIÊGAS, 2010).

Os triacilglicerídeos (TAG) são lipídeos derivados de ácidos carboxílicos constituídos por três moléculas de ácidos graxos esterificadas a uma molécula de glicerol. Normalmente, os TAG são moléculas de reserva (armazenamento de energia) e principais constituintes de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal, cujas propriedades físicas variam de acordo com o seu índice de saturação: as gorduras têm um ponto de fusão maior quando comparado aos óleos por apresentarem mais ácidos graxos saturados em sua estrutura, sendo sólidas na temperatura ambiente (NELSON; COX, 2018).

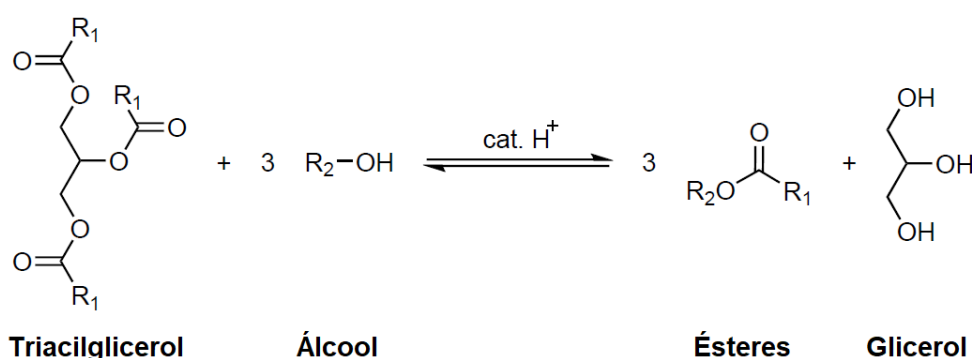
Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com no mínimo 12 átomos de carbonos em sua cadeia hidrofóbica, podendo esta ser saturada (SFA, do inglês *saturated fatty acids*), mono-insaturada (MUFA, do inglês *monounsaturated fatty acids*), di-insaturada (DUFA, do inglês *di-unsaturated fatty acids*), tri-insaturada (TUFA, do inglês *tri-unsaturated fatty acids*) ou poli-insaturada (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) (RAMOS *et al.*, 2017).

A busca por matrizes competitivas, que forneçam matéria-prima de qualidade para a produção industrial de biodiesel, é um dos grandes desafios para a expansão desse mercado. Atualmente, a soja lidera o *ranking* de matérias-primas para a produção de biodiesel no Brasil, não por apresentar elevada produtividade de lipídeos, mais sim por estar presente em larga escala em quase todo o país. No entanto, essa prática tem sido muito criticada por ambientalistas não apenas pelo impacto ambiental da expansão da fronteira agrícola, mas também pela competição que apresenta com aplicações da soja na indústria alimentícia (SOUZA *et al.*, 2017).

A produção do biodiesel se dá majoritariamente por três vias: transesterificação, esterificação e hidroesterificação. A mais utilizada pela indústria é a transesterificação (FIGURA 2), que pode ser realizada empregando processos

homogêneos ou heterogêneos, baseados em catálise básica, ácida ou enzimática. Esse processo se refere à alcoólise de TAG, na qual o triálcool (glicerol) é substituído por um álcool mono-hidroxilado de baixa massa molar (ex., metanol e etanol). Tal reação de substituição nucleofílica ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis que tem como intermediários os mono e diacilglicerídeos correspondentes (SUAREZ *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2011).

FIGURA 2 – ESQUEMA DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE UM TRIACILGLICERÍDEO.



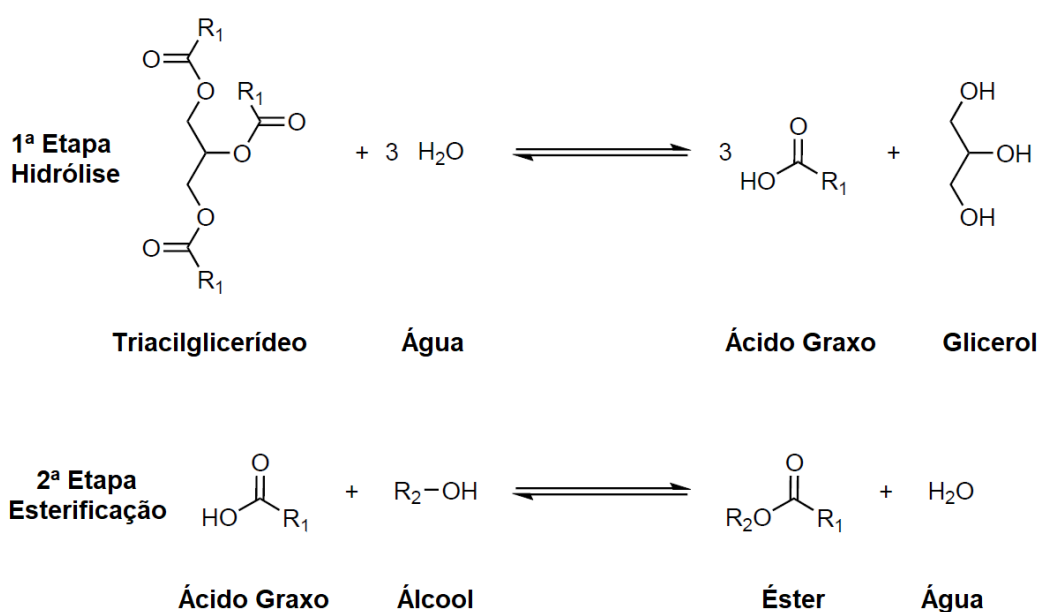
FONTE: O autor (2019).

A partir de matrizes ácidas com elevada quantidade de ácidos graxos livres (borras ácidas, gorduras de descarte, óleo residual, etc.) e um certo teor de umidade, as reações de esterificação ou hidroesterificação são as mais adequadas para a produção de biodiesel por evitar a formação de sabões. Como exemplo, a reação de hidroesterificação é um processo que ocorre em duas etapas (FIGURA 3). Inicialmente, a gordura ou óleo é hidrolisado em meio aquoso gerando ácidos graxos e glicerina, seguido da esterificação dos ácidos graxos livres produzidos (RAMOS *et al.*, 2017).

A síntese do biodiesel pode ser realizada a partir do extrato lipídico ou diretamente da biomassa por um processo *in situ*. Projetando uma maior valorização da biomassa de microalgas em processos industriais de biorrefinaria, a utilização

dos extratos graxos demonstra-se mais interessante pelo fato de permitir a recuperação total da biomassa residual pós extrações (ZHU, 2015), algo inviável a partir das reações *in situ*. A partir da biomassa residual novos produtos podem ser gerados, como biocombustíveis a partir da fermentação dos carboidratos, ração animal dado o seu alto teor proteico e insumos farmacêuticos baseados no poder antioxidante dos pigmentos e biomateriais, dentre outros.

FIGURA 3 – ESQUEMA DE HIDROESTERIFICAÇÃO DE UM TRIACILGLICERÍDEO.



FONTE: O autor (2019).

A produção de biodiesel é regida por parâmetros de qualidade que garantem a comercialização de um biocombustível aderente às especificações de normas técnicas de ampla aceitação internacional. Dentre elas encontram-se as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), da "American Society for Testing and Materials" (ASTM), da "International Organization for Standardization" (ISO) e do "Comité Européen de Normalisation" (CEN). Atualmente, a Resolução vigente no

Brasil é a ANP 45/2014 (Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014), cujas especificações que controlam a produção e uso de biodiesel no país (TABELA 2).

TABELA 2 – ESPECIFICAÇÕES DO BIODIESEL SEGUNDO A AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP).

Característica	Unidade	Limite
Massa específica a 20 °C	Kg/m ³	850 a 900
Viscosidade cinemática a 40 °C	mm ² /s	3,0 a 6,0
Teor de água, máx.	mg/Kg	200
Contaminação total, máx.	mg/Kg	24
Ponto de fulgor, mín.	°C	100
Teor de éster, mín.	% massa	96,5
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020
Enxofre total, máx.	mg/Kg	10
Sódio + Potássio, máx.	mg/Kg	5
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/Kg	5
Fósforo, máx.	mg/Kg	10
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	–	1
Número de cetano	–	Anotar
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	5 – 14 °C
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02
Glicerol total, máx.	% massa	0,25
Monoacilglicerídeo, máx.	% massa	0,7
Diacilglicerídeo, máx.	% massa	0,20
Triacilglicerídeo, máx.	% massa	0,20
Metanol e/ou etanol, máx.	% massa	0,20
Índice de iodo	g/100g	Anotar
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.	h	6

FONTE: Resolução ANP 45/2014.

Baseando-se na influência da composição e das propriedades de óleos vegetais transesterificados (palma, oliva, amendoim, canola, soja, girassol,

amêndoa, milho e sementes de uva) sobre as propriedades combustíveis do biodiesel formado, Ramos *et al.* (2009) demonstraram que, através do grau de insaturação (DU, do inglês *Degree of Unsaturation*) e do fator de cadeia longa saturada (LCFS, do inglês *Long Chain Saturated Factor*), é possível prever algumas das principais propriedades combustíveis (estabilidade de oxidação, número de cetano, valor de iodo e ponto de entupimento do filtro frio) do biodiesel que constam nas normas europeias para especificação do produto.

Posteriormente, Nascimento *et al.* (2013) e Talebi *et al.* (2013) estimaram o número de cetano (CN, do inglês *cetane number*) e valor de iodo (IV, do inglês *iodine value*) de diversos óleos produzidos a partir de microalgas de diferentes classes (13 espécies de Chlorophyceae; 6 espécies de Trebouxiophyceae e 1 espécie de Bacillariophyceae) empregando o modelo correlativo empírico proposto por Krisnangkura (1986). Já a estimativa de outras propriedades seguiu as recomendações do estudo realizado por Ramos *et al.* (2009). Esses autores demonstraram a eficiência das equações empíricas no cálculo das propriedades combustíveis de diferentes microalgas com potencial para uso na produção de biodiesel.

Através do cultivo da microalga *Chlorella minutíssima* em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, Arora *et al.* (2016) observaram uma modificação quantitativa no perfil de ácidos graxos e demonstraram variações nas propriedades combustíveis a partir do emprego das equações empíricas propostas por Ramos *et al.* (2009). A partir de comparações diretas com as propriedades combustíveis de óleos convencionais (pinhão-manso e palma), e do óleo da microalga apresentou melhores CN, CFPP, IV e estabilidade oxidativa quando produzido em meios contendo limitação de nitrogênio e fosfato.

Calixto *et al.* (2018) aplicaram as equações empíricas na predição das propriedades combustíveis de 6 clorofíceas e 6 cianobactérias isoladas da região nordeste do Brasil, prospectando assim a aplicação dos óleos produzidos para a síntese de biodiesel. Os dados demonstraram a grande variação entre os perfis graxos de diferentes filos de microalgas, assim como a potencialidade produtiva e boas propriedades combustíveis dos lipídeos isolados da clorofícea *Chlorella* sp.

Embora o biodiesel de microalgas não consiga competir com o diesel fóssil em relação a sua rentabilidade, estudos vêm sendo desenvolvidos para reverter essa ótica e assim torná-lo economicamente viável. Um fator relevante é que o cultivo das microalgas promove a assimilação de CO₂ atmosférico por meio do metabolismo celular, contribuindo com os mecanismos de controle de seu acúmulo na atmosfera (sequestro de carbono) e gerando lucros adicionais a partir do mercado de créditos de carbono. Isso, juntamente a outros fatores já discutidos nesse trabalho, podem fazer com que as microalgas possam vir a ser uma alternativa viável para a produção de biodiesel, de modo a participarem como componentes efetivos da matriz energética nacional.

Apesar das perspectivas de utilização da biomassa de microalgas para produção de biodiesel, alguns desafios de produção ainda limitam esse mercado como os custos associados ao cultivo, à secagem (devido ao elevado gasto energético necessário para eliminar os altos teores de água presentes na biomassa, que geram sérios problemas de conversão) e à extração dos lipídeos da microalga (BALAT, 2011). Outro desafio se concentra nas propriedades dos ácidos graxos que vão compor o biodiesel. As microalgas produzem muitos ácidos graxos poli-insaturados que são mais susceptíveis à oxidação, sendo necessária a adição de

antioxidantes que aumentam os custos de comercialização do produto (CHISTI, 2007).

Uma das saídas para este problema é a prospecção por espécies com alta produtividade de lipídeos e perfil graxo mais específico para produção de biodiesel, além do desenvolvimento de parâmetros de reprodutibilidade para cultivos realizados em larga escala (FISCHER *et al.*, 2008; CALIXTO *et al.*, 2018). Tendo prospectadas as espécies de maior potencial e estabelecidas as condições de cultivo, modificações genéticas podem ser aplicadas visando aprimorar e intensificar a produção dos metabólitos de interesse. Pesquisas voltadas para a criação de microalgas geneticamente modificadas tem se intensificado na literatura e demonstrado o potencial destas cepas mutantes para a produção de biodiesel (LI *et al.*, 2010a; QI *et al.*, 2016).

O bloqueio da via de biossíntese do amido por meio de modificações genéticas aumenta a produção de lipídeos neutros nas células de microalgas devido ao redirecionamento metabólico do carbono assimilado fotossinteticamente. Após realizar danos em subunidade da ADP-glucose pirofosforilase da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* LI *et al.* (2010b) observaram um pequeno aumento na produtividade de lipídeos neutros. Porém, ao submeter as cepas mutantes a estresses fóticos e depleção de nitrogênio, foi possível obter um aumento de 8 vezes da concentração celular de lipídeos neutros quando comparado à cepa selvagem.

Entre os vários métodos de modificação genética aplicados podemos destacar também a utilização de substâncias químicas potencialmente mutagênicas, em especial a utilização do metanossulfonato de etila (EMS, do inglês *Ethyl Methyl Sulphonate*), agindo particularmente na substituição de nucleotídeos (alquilação de guanina) e produzindo mutações aleatórias (CHATURVEDI; FUJITA, 2006; LEE *et*

al., 2014). Através da adição de EMS em diferentes cultivos da microalga selvagem *Chlorella minutissima* Mehtani *et al.* (2017) selecionou os três mutantes que apresentaram melhor taxa de crescimento e constataram na cepa CM7 um aumento de quase duas vezes no teor lipídico obtido em relação à cepa selvagem (27%). Além de um aumento na produção de pigmentos fotossintetizantes, foi observada uma maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados no perfil lipídico das cepas mutantes.

Agentes físicos também podem ser utilizados na indução de modificações genéticas, como é o caso do uso de radiação ultravioleta (UV). Células da microalga *Nannochloropsis oculata* foram submetidas ao UV e ao herbicida Quizalofop-P-etílico visando selecionar aleatoriamente os microrganismos com maior resistência a estes agentes mutagênicos e um aumento no conteúdo lipídico e na produção de biomassa. A cepa mutante S3 apresentou os melhores resultados em relação ao cultivo da microalga selvagem. Além do rápido crescimento foi percebido um aumento de 5X do ácido araquidônico e a duplicação na produção dos ácidos oleico e heptadecaenóico.

Através do sequenciamento completo do genoma microbiano e do desenvolvimento de novas metodologias de edição genômica, como é o caso das Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas (CRISPR, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), é possível ocasionar lesões direcionadas em certas porções do DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*) e desencadear implementações metabólicas nos organismos. Utilizando-se dessa técnica, Shin *et al.* (2019) ocasionaram a eliminação do gene mediador na produção da enzima Fosfolipase A2, responsável pela clivagem de fosfolipídios da parede celular em ácidos graxos. Através da depleção de nitrogênio

nos cultivos, foi observado um aumento no acúmulo lipídico, como também um aumento de 190% no acúmulo de TAG durante a fase de crescimentos das células mutantes. A partir dessas informações pode-se perceber a importância da continuidade das pesquisas envolvendo o uso de microalgas para a produção de biocombustíveis como o biodiesel.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

A microalga *Muriella decolor* (*M. decolor*, Chlorophyceae) foi isolada do Rio Madeira (Rondônia, Brasil) e mantida na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade de São Carlos (UFSCar - Brasil). As culturas foram desenvolvidas no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC – Brasil) em tanques de 500 L empregando Meio BBM (ANDERSEN, 2005) modificado, em uma dosagem de 30% do meio original. As culturas foram desenvolvidas sob condições naturais de iluminação e temperatura (24 a 27 °C), sob agitação constante por borbulhamento com ar atmosférico. A densidade celular e a biomassa foram monitoradas diariamente até que as culturas alcançassem o início da fase estacionária, caracterizada por ausência de crescimento por 2 dias consecutivos. Nesse momento as células foram separadas por centrifugação (6.000 xg) sem a adição de flocculantes. Então, a pasta de microalgas foi congelada contendo 20% de sólidos totais em média.

O seu transporte até o Centro de Pesquisa em Química Aplicada (UFPR) foi realizado em condições herméticas. Os blocos foram armazenados em freezer a -20°C para procedimentos posteriores. Todos os reagentes utilizados para este estudo foram de grau analítico visando minimizar possíveis erros experimentais, sendo estes: etanol (Neon - 99,8%); heptano (Sigma Aldrich – UV/HPLC - 99,5%); hexano (Neon); metanol (Neon - 99,8%); clorofórmio (Neon - 99,8%); ácido sulfúrico (Merck – 95-97%); cloreto de amônio (Sigma Aldrich – 99,%); cloreto de potássio (Sigma Aldrich – 99-105%); vanilina (Sigma Aldrich – 99%), glucose anidra (Sigma Aldrich) e o reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich).

A espessa pasta da biomassa de microalgas descongelada foi submetida a dois diferentes processos de secagem, sublimação e evaporação. Uma parte do material foi seco por liofilização em equipamento de bancada da JOUAN (modelo LP3) durante 24 h, enquanto que a outra foi disposta em uma placa de vidro e colocada em estufa com circulação de ar (TECNAL, TE-394/1; FIGURA 4) a 35 °C por um período mínimo de 24 h (CRAMPON *et al.*, 2013).

FIGURA 4 – SECAGEM EM ESTUDA DE CIRCULAÇÃO FORÇADA DA BIOMASSA ÚMIDA DE *M.decolor*.



FONTE: O autor (2019).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA

4.2.1 Análise de umidade

As amostras da microalga seca por diferentes métodos de secagem foram submetidas à análise de umidade conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO *et al.*, 2008), que consiste em pesar 2 g de amostra em cadinho de porcelana previamente limpo e seco. A amostra foi mantida em estufa a 105 °C por 3 h até massa constante. O resultado foi expresso em % (m/m) e calculado pela Equação 1,

$$U = \left(\frac{100 * N}{P} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

onde o U é a umidade, N representa a perda de massa em grama e o P a massa da amostra inicial.

4.2.2 Análise de cinzas

Esta análise seguiu a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBON *et al.*; 2008). Foram pesados 2 g da amostra em cadinhos de porcelana, previamente limpos e calcinados. Em seguida as amostras foram carbonizadas em manta de aquecimento e transferidas para mufla, onde foram mantidas por 4 h a 550 °C. Posteriormente, os cadinhos foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. Os resultados foram expressos em percentual (%) e calculados conforme a equação 1.

4.2.3 Proteínas hidrossolúveis

Para determinação de proteínas hidrossolúveis na biomassa seca foi aplicado o método descrito por Lowry; Randall (1951). Esta análise foi realizada na biomassa antes (*in natura*) e depois do processo de extração. Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L (Solução A), uma solução de sulfato de cobre II penta-hidratado a 0,5% (solução B) e uma solução de tartarato de sódio e potássio a 1% (solução C). Posteriormente foi preparada uma solução mista denominada D, composta das soluções A, B e C na proporção volumétrica de 100:1:1. Finalmente, a solução E foi preparada diluindo o reagente Folin-Ciocalteu com água destilada na proporção volumétrica de 1:1.

Para a tratamento alcalino da biomassa seca, 5 mg de amostra foram tratados com 2 mL de NaOH 1 mol/L a 100 °C por 1 h em banho-maria. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 min na temperatura ambiente para a obtenção do extrato alcalino. Uma alíquota de 1 mL do extrato (sobrenadante) foi transferida para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 5 mL da solução D. Em seguida o material foi agitado em Vortex e deixado em repouso por 10 min. Passados 10 min foram acrescentados 0,5 mL da solução E, que foram misturados em vortex e deixados em repouso por 30 min na temperatura ambiente. Posteriormente, seguiu-se à leitura do material por espectrofotometria no ultravioleta em equipamento VARIAN, modelo Cary 100 Scan, empregando o comprimento de onda de 750 nm. A curva padrão para quantificação do teor de proteínas nas amostras foi preparada usando soroalbumina bovina como padrão nas concentrações de 0 a 400 µg/mL.

4.2.4 Carboidratos totais

A determinação dos teores de carboidratos totais na biomassa seca seguiu as técnicas de Dubois et al. (1956) Esta análise foi realizada na biomassa antes (*in natura*) e depois do processo de extração.

Inicialmente a biomassa seca foi submetida ao mesmo tratamento alcalino descrito acima. Posteriormente, alíquotas de 0,5 mL do extrato (sobrenadante) foram transferidas para tubos de ensaio, que receberam 1 mL de NaOH 1 mol/L mais 0,5 mL de Fenol 4%. Após agitação em vortex e 30 min de descanso, procedeu-se o acréscimo de 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, seguido de agitação em vortex. O material foi esfriado até a temperatura ambiente e depois analisado por espectrofotometria em equipamento VARIAN, modelo Cary 100 Scan, empregando o

comprimento de onda de 485 nm. A curva padrão para quantificação do teor de carboidratos nas amostras foi preparada usando glucose anidra como padrão nas concentrações de 0 a 400 µg/mL.

4.2.5 Lipídeos totais

A quantificação dos lipídeos totais na biomassa seca se deu pelo método de vanilina, conforme Mishra *et al.* (2014). O reagente foi preparado adicionando 0,6 g de vanilina a 1 mL de etanol absoluto e 90 mL de água deionizada. Essa mistura foi agitada continua e lentamente durante a adição de 400 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4). A solução obtida foi então armazenada no escuro até sua utilização.

Inicialmente 100 µL de água deionizada e 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; 98%) foram adicionados em tubo de ensaio contendo 1 mg de biomassa seca e este foi aquecido por 10 min a 100 °C. Posteriormente os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo por 5 min e adicionados de 5 mL de solução de vanilina fosfórica. Os tubos foram então incubados por 15 min a 37 °C em incubadora a 200 rpm. A leitura do material resultante foi realizada por espectrofotometria em equipamento VARIAN, modelo Cary 100 Scan, empregando o comprimento de onda de 530 nm. A curva padrão para quantificação do teor de lipídeos totais nas amostras foi preparada usando óleo de soja comercial vendido em supermercados como padrão. Preparou-se uma solução de 2 mg/mL do óleo comercial em clorofórmio e essa foi armazenada a sob refrigeração em recipiente vedado até o uso. Posteriormente foi realizada uma diluição seriada da solução padrão na faixa de concentração de 0 a 300 µg/mL em tubos vazios devidamente limpos. Os tubos foram então aquecidos a 60 °C durante 10 min para completa evaporação do solvente e só então foi dado prosseguimento à análise.

4.3 PROCESSOS EXTRATIVOS

4.3.1 Extração convencional

O sistema Soxhlet foi utilizado nos processos de extração convencional. As composições de solventes a serem testadas foram as mesmas empregadas por Baumgardt *et al.* (2016) e Escorsim *et al.* (2018). Foram transferidos para um cartucho de papel filtro aproximadamente 5 g de biomassa seca e este foi alocado em extrator Soxhlet com capacidade para 250 mL. Em seguida foram adicionados 200 mL de solvente a um balão de evaporação previamente limpo e pesado. O balão foi conectado ao extrator e este ao condensador, sendo o conjunto mantido em manta de aquecimento por um período de 12 h. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada solvente e suas misturas volumétricas: etanol, hexano, clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e hexano:etanol (2:1, v/v). Transcorrido esse período, o solvente foi destilado em evaporador rotativo e o extrato retido no balão foi posteriormente seco em estufa a 60 °C para retirada do solvente residual. O balão contendo o extrato foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado.

O rendimento bruto do extrato lipídico (RBEL) foi calculado subtraindo-se a massa do balão após o processo de extração, de onde se obteve a massa do extrato (m_E), seguida da divisão pela massa da amostra de biomassa (m_A) de microalga de acordo com a Equação 2.

$$RBEL = \left(\frac{m_E}{m_A} \right) * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Amostras dos extratos oriundos de cada composição de solvente foram coletadas e o perfil graxo analisado de acordo com os parâmetros cromatográficos

indicados no item 4.4.1. Amostras do conteúdo dos cartuchos de cada extração também serão analisados conforme descrito nos itens 4.2.3, 4.2.4 e 4.2.5 para se determinar a composição centesimal na biomassa residual.

4.3.2 Extração pelo método de Bligh; Dyer (1959)

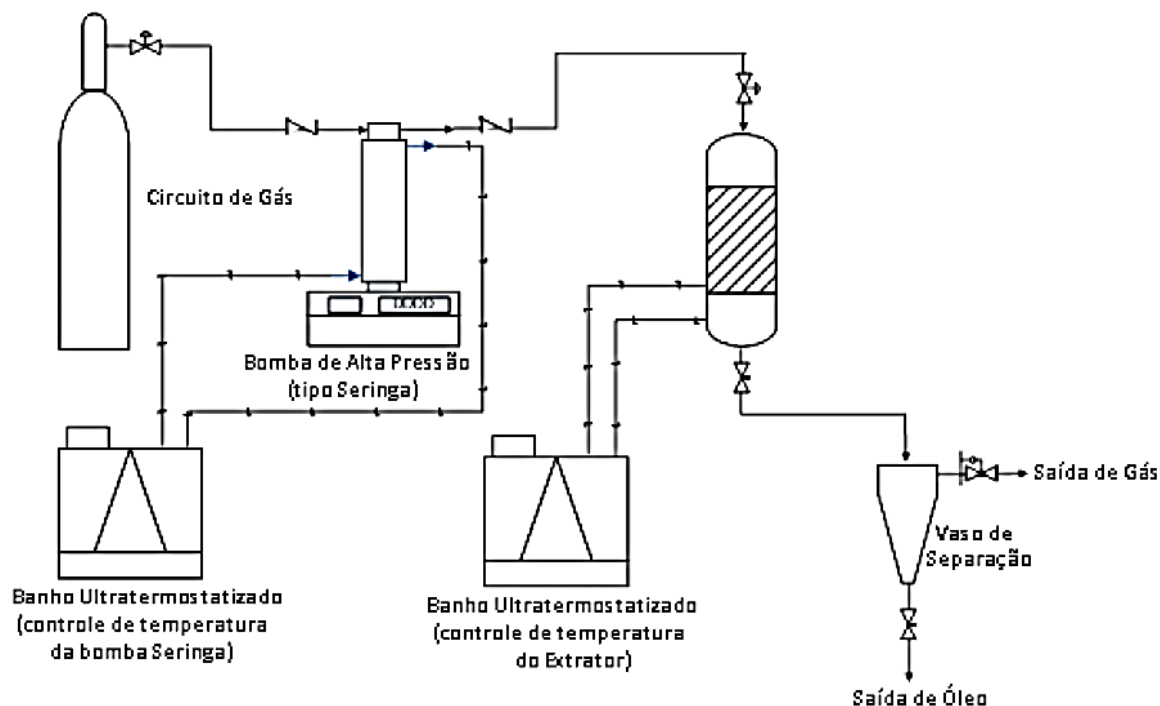
Os lipídeos também foram extraídos da biomassa seca usando o método de Bligh; Dyer (1959) adaptado por Borges *et al.* (2016). Inicialmente 0,5 g da biomassa seca foi transferido para tubos de ensaio, que foram adicionados de 1,5 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v). A solução foi tratada em banho de ultrassom da marca Branson, modelo B-220 (40 kHz), durante 20 min na temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 2 min a 1851 g. O processo extrativo foi repetido três vezes para cada tubo de ensaio. As fases líquidas foram então transferidas para um balão de evaporação previamente pesados e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. A fração lipídica total foi determinada gravimetricamente e o conteúdo lipídico calculado com base na porcentagem do peso seco inicial.

4.3.3 Extração em sistema de fluxo contínuo em solvente pressurizado

Os experimentos de extração do óleo de microalga com fluido pressurizado foram realizados em um extrator batelada conforme descrito por Rodriguez *et al.* (2018). O sistema de extração era formado por um vaso de aço encamisado ($L = 0,22$ m, $\varphi = 1,90 \times 10^{-2}$ m, volume interno de $6,24 \times 10^{-5}$ m³) conectado a um banho ultratermostático para manter a temperatura experimental constante durante o período de confinamento e extração dinâmica. O vaso ainda estava conectado a uma bomba seringa de alta pressão (TELEDYNE ISCO 500D), que permite a

compressão do gás e sua injeção na célula extratora com o auxílio de válvulas. Essa bomba seringa foi mantida a 10 °C por um segundo banho ultratermostatizado. O esquema que representa o sistema de extração está apresentado na FIGURA 5.

FIGURA 5 – ESQUEMA DO APARATO EXPERIMENTAL PARA AS EXTRAÇÕES DE ÓLEO COM FLUIDO PRESSURIZADO



FONTE: Mesomo (2013).

A biomassa da microalga *M. decolor* foi seca tanto em estufa a 35 °C quanto pelo processo de liofilização, conforme descrito anteriormente. Após a secagem, a biomassa foi triturada em moinho de facas e posteriormente peneirada, sendo que a fração com partículas de 0,5 mm foi separada para a realização das extrações. Inicialmente, os banhos ultratermostatizados foram ligados e assim permaneceram até atingir a temperatura desejada para realização dos ensaios. Paralelamente, o gás foi injetado e pressurizado no interior da bomba seringa. Antes de cada extração, um chumaço de algodão foi colocado nas partes inferior e superior do vaso de extração para evitar o entupimento das válvulas. Ao todo, 45 g de biomassa seca

foram transferidos para o interior da célula extratora, que foi fechada logo em seguida. O gás pressurizado foi adicionado com auxílio da bomba seringa até atingir a pressão previamente definida para o experimento, para só daí ser iniciada a extração. O material foi mantido confinado no interior do vaso extrator por 90 min. Ao final desse tempo, amostras foram coletadas a cada 5 min nos primeiros 20 min de extração. Posteriormente, a coleta foi feita a cada 10 min até não se observar mais a saída de extrato pela válvula de purga do extrator, totalizando cerca de 100 min para o propano subcrítico e 140 min para o CO₂ supercrítico.

As curvas que representam a cinética das extrações em cada condição foram construídas com base nas quantidades de extrato obtidas ao longo do tempo. Em todos os experimentos a vazão de gás foi mantida em 2 mL/min durante a extração. Imediatamente após a coleta o tubo foi pesado em balança analítica e a massa do óleo obtida foi determinada gravimetricamente. A partir desses dados o RBEL foi calculado de acordo com os termos da Equação 2.

O perfil de ácidos graxos presentes nos óleos oriundos das extrações foi analisado conforme descrito nos itens 4.4.1. A biomassa residual de cada extração também foi analisada conforme os itens 4.2.3, 4.2.4 e 4.2.5 para se determinar a composição de proteínas, carboidratos e lipídeos. Os experimentos de extração foram realizados em triplicata nas melhores condições de extração que foram apresentadas por Da Cruz Lima *et al.* (2018) para a microalga dulcícola *Choricystis minor* var. *minor*, utilizando o mesmo sistema de extração (TABELA 3).

TABELA 3 – CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO ENCONTRADAS POR DA CRUZ LIMA *et al.* (2018).

Extração	Gás	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Biomassa
A	Propano subcrítico	80	100	<i>in natura</i>
B	CO ₂ supercrítico		250	

4.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS

4.4.1 Rendimento Bruto de Esterificação Metílica

O rendimento bruto de esterificação metílica (RBEM) foi determinado na microalga *in natura* e nos extratos obtidos das extrações segundo a metodologia desenvolvida por Menezes *et al.* (2013), processo de saponificação, neutralização e esterificação (SNE).

Inicialmente foi preparada uma solução esterificante pela dissolução de 2 g de cloreto de amônio em 60 mL de metanol, seguida da adição de 3 mL de H_2SO_4 concentrado. Posteriormente, 200 mg das amostras foram transferidos para tubos de ensaio com tampa rosqueável, aos quais foram adicionados 3 mL de NaOH 0,5 mol/L em metanol. Os tubos foram fechados e aquecidos a 90 °C em banho-maria por 10 min para conclusão da primeira etapa, que corresponde à saponificação do material. Após este período, as amostras seguiram ao resfriamento em banho de gelo e 9 mL da solução esterificante foram adicionados em cada tubo. Novamente, os tubos foram aquecidos a 90 °C por 10 min e em seguida resfriados até a temperatura ambiente, concluindo assim a etapa de esterificação. Aos tubos foram adicionados 5 mL de heptano e 2 mL de água destilada, em seguida foram agitados e depois centrifugados visando a separação de fases de forma mais rápida. Posteriormente, 5 mL da fração heptânica foram coletados e esse procedimento foi realizado mais duas vezes visando extrair todos os ésteres sintetizados. As diferentes frações foram reunidas e transferidas para um frasco previamente pesado, que foi mantido em estufa a 60°C até peso constante para posterior pesagem. O rendimento bruto de esterificação metílica (RBEM) foi determinado segundo a Equação 3,

$$RBEM(\%) = \left(\frac{m_F - m_I}{m_I} \right) * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde para o cálculo de RBEM o m_F é a massa final obtida no processo de esterificação e m_I é a massa inicial da biomassa antes da esterificação. Posteriormente, a amostra foi solubilizada em heptano e submetida à análise cromatográfica, conforme parâmetros apresentados no item 4.4.3.

4.4.2 Teor de ésteres totais

Inicialmente os extratos lipídicos foram convertidos em ésteres metílicos para determinação dos Rendimentos Mássicos em Ésteres Metílicos (RMEM) utilizando o método de SNE (saponificação, neutralização e esterificação) desenvolvido por Menezes *et al.* (2013). A partir dessa informação foi possível identificar qual o melhor solvente extrator para lipídeos da microalga.

A título de confirmação dos rendimentos determinados a partir da síntese de ésteres pelo método de SNE, os extratos obtidos por extração em Soxhlet com hexano e propano subcrítico foram submetidos a uma transesterificação ácida de acordo com o procedimento descrito por D'Oca *et al.* (2011). Estes extratos foram escolhidos por terem proporcionado maior seletividade para a extração de lipídeos neutros e, portanto, apresentarem maior potencial a produção de biodiesel.

Para os ensaios de transesterificação ácida, 5 g de extrato foram pesados em um balão de fundo redondo pequeno. A reação foi realizada usando 20% de H_2SO_4 em metanol seco, seguindo uma razão molar de 30:1 entre metanol e o extrato lipídico. A reação foi conduzida por 4 h em banho de óleo a 80-90 °C sob agitação constante. O balão foi conectado a um condensador de forma que a reação estivesse em refluxo constante. Após o tempo proposto para a reação, o excesso de

metanol foi evaporado e os ésteres produzidos foram solubilizados em hexano. A solução hexânica foi lavada com água, desidratada com sulfato de sódio anidro e evaporada à secura. Os produtos de transesterificação ácida foram determinados com auxílio da Equação 3 e depois solubilizados em heptano para seguir à análise cromatográfica e posterior quantificação do Rendimento Mássico em Ésteres Metílicos (RMEM) por padronização externa empregando a Equação 4, conforme descrito no item 4.4.3,

$$RMEM(\%) = \left(\frac{RBEM \times EC}{EM} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

onde EC é a massa de éster quantificados em cromatografia por padronização externa e EM é a massa bruta de ésteres metílicos presente no frasco antes da injeção em cromatógrafo.

4.4.3 Perfil e teor de ésteres metílicos de ácidos graxos

A mistura de ésteres metílicos, obtidos segundo as metodologias propostas por Menezes *et al.* (2013) e por D'oca *et al.* (2011), foram solubilizadas na mesma quantidade de heptano presente antes da análise gravimétrica, para posterior análise por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (GC-MS). As análises foram realizadas em sistema Shimadzu GCMS-QP2010 SE com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, empregando uma coluna capilar VF-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm). Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µL no modo splitless. As temperaturas do injetor, do *manifold*, da linha de transferência e da fonte de íons foram ajustadas em 315, 40, 280 e 300 °C, respectivamente. A pressão na cabeça

da coluna cromatográfica foi de 2 mmTorr e essa foi programada para operar inicialmente a 100 °C por 1 min, seguida de aquecimento a 10 °C/min até atingir 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 2 min para depois ser novamente aquecida a 3,5 °C/min até atingir 260 °C, onde permaneceu até o final da análise (37 min). Os espectros foram coletados a cada 0,5 s, na faixa de 32 a 380 m/z.

Para a identificação dos ésteres graxos, foi realizada a comparação com os tempos de retenção dos padrões de monoésteres metílicos da mistura FAME (do inglês, *fatty acid methyl esters*) C4-C24 da Supelco[®], juntamente à análise do grau de similaridade (>90%) obtido por comparação entre o espectro de massas da substância e os espectros disponíveis no banco de dados da biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) instalada no equipamento.

A determinação do perfil de ácidos graxos da microalga *M. decolor* foi realizada por normalização de área dos picos cromatográficos obtidos por GC-MS, de modo a comparar se a distribuição em FAME era a mesma. Por outro lado, o rendimento mássico em ésteres metílicos (RMEM) foi quantificado por padronização externa apenas para os extratos da extração convencional com hexano e da extração com propano subcrítico. A curva analítica para a determinação do RMEM foi preparada usando o heptadecanoato de metila (C19:0) como padrão externo. Inicialmente, uma solução de C19:0 em heptano foi preparada na concentração de 1 mg/mL e um gradiente de concentração de 0,025 a 1 mg/mL foi preparado por diluição.

4.5 PREVISÃO DE PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS EM ÉSTERES METÍLICOS

As propriedades combustíveis foram calculadas seguindo um modelo correlativo empírico, tomando por base o trabalho desenvolvido por Talebi *et al.*

(2013) e Calixto *et al.* (2018) com diferentes microalgas. Inicialmente foi necessário calcular os níveis de insaturação das cadeias graxas (ADU, do inglês *Degree of fatty acid unsaturation*) a partir da equação 5,

$$ADU = \sum M * Y \quad (\text{Equação 5})$$

onde o M é a fração em massa do ácido graxo constituinte e Y é o número de ligações duplas presente em cada ácido graxo. A partir do cálculo do ADU, foram empregadas as Equações de 6 a 10,

$$\rho = (-0,6316 * ADU) + 5,2065 \quad (\text{Equação 6})$$

$$\varphi = (0,0055 * ADU) + 0,8726 \quad (\text{Equação 7})$$

$$CN = (-6,6684 * ADU) + 62,876 \quad (\text{Equação 8})$$

$$IN = (74,3733 * ADU) + 12,71 \quad (\text{Equação 9})$$

$$HHV = (1,7601 * ADU) + 38,534 \quad (\text{Equação 10})$$

onde ρ é a viscosidade cinemática a 40 °C, φ é a densidade, CN (do inglês *cetane number*) é o número de cetano, IN (do inglês *iodine number*) é o número de Iodo e HHV (do inglês *Higher Heating Value*) é o poder calorífico da amostra.

O fator de saturação de cadeia longa (LCSF, do inglês *Long Chain Saturated Factor*) foi calculado levando em consideração a composição de ácidos graxos saturados e conferindo valores de maior peso aos ácidos graxos de maior massa molar (equação 11). Esse valor foi de suma importância para o cálculo do ponto de entupimento do filtro a frio (CFPP, do inglês *Cold Filter Plugging Point*) das amostras, conforme indicam os termos da equação 12.

$$LCSF = (0,1 * C16) + (0,5 * C18) + (2 * C24) + (2,5 * C26) \quad (\text{Equação 11})$$

$$CFPP = (3,14 * LCSF) - 16,477 \quad (\text{Equação 12})$$

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados experimentais foram expressos em relação à média com o seu respectivo desvio padrão, normalmente com $n = 3$ (triplicata). As análises foram realizadas usando o programa livre R versão 3.4.1, com 5% de nível de significância. Todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade, sendo a partir deste escolhido o tipo de análise aplicada. Entre os tipos de secagem da biomassa foram realizados o teste T-student. Já para as análises com mais de duas variáveis, a análise de variância univariada (*one-way-ANOVA*) foi aplicada, seguida do teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO

5.1.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Inicialmente, a biomassa da microalga *M. decolor* foi seca por liofilização e por tratamento térmico em estufa para verificar se o método de secagem interferiria na composição química do material. Além disso, a secagem foi estratégica para manter a integridade e auxiliar na conservação do produto (MUJUMDAR; MENON, 1995). A TABELA 4 apresenta a composição química da biomassa em base úmida e em base seca.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BIOMASSA DE *M. decolor* SECA EM ESTUFA E EM LIOFILIZADOR EM RELAÇÃO À SUA MASSA ÚMIDA E MASSA SECA.

Componente	Composição (g/100 g) ¹	
	Estufa (35°C)	Liofilizador
Água ²	7,98±0,06 ^a	4,92±0,11 ^a
Cinzas ²	7,07±0,05 ^a (7,68)	7,53±0,19 ^a (7,91)
Proteínas Hidrossolúveis ³	20,90±0,50 ^b (22,72)	18,69±0,79 ^b (19,66)
Carboidratos Totais ⁴	12,42±1,76 ^c (13,50)	13,51±1,72 ^c (14,20)
Lipídeos Totais ⁵	14,05±1,43 ^c (15,27)	10,85±0,89 ^c (11,41)
Outros metabólitos (por diferença)	37,57 (41,44)	44,51 (47,19)
TOTAL	100	100

Fonte: O autor (2019).

Legenda: ¹Valores em parênteses foram calculados em relação à biomassa seca; Determinações realizadas segundo ²Zenebon *et al.* (2008); ³Lowry; Randall (1951); ⁴Dubois *et al.* (1956); ⁵Mishra *et al.* (2014). As letras a, b e c representam a análise estatística de cada variável dentre os métodos de secagem. Valores marcados com letras iguais não diferem significativamente entre si (Teste-t de Student, p > 0,05).

Apesar da biomassa ser submetida a um regime de secagem de 24 h, ainda foi possível constatar a presença de água nas amostras indiferentemente do método de secagem. A maior retenção de umidade foi observada na biomassa seca em estufa (7,98%), provavelmente devido à suavidade na secagem convectiva do

material a uma temperatura branda. A presença de água nas amostras depois do processo de secagem é algo certamente importante por poder interferir nas extrações realizadas com solventes polares, hidratando-os.

A biomassa seca em estufa foi a que apresentou os maiores percentuais de metabólitos (proteínas e lipídeos), apesar de ter o maior teor de água em sua composição (7,98%), quando comparada à biomassa seca em liofilizador (4,92%). As diferenças entre os resultados obtidos foram atribuídas à problemas de heterogeneidade nas amostras, já que a liofilização é um processo menos agressivo que a secagem em estufa.

Ansari *et al.* (2018) demonstraram que diferentes métodos de secagem (secagem ao sol, liofilização e secagem em estufa) da biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* influenciaram na quantidade de metabólitos extraíveis. Esses autores constataram que a biomassa liofilizada apresentou os melhores resultados de extração que todos os demais testes de secagem, porém, os rendimentos proteicos encontrados na microalga liofilizada ($31,07 \pm 2,81\%$) foram comparáveis aos obtidos a partir da microalga seca em estufa ($30,98 \pm 1,82\%$).

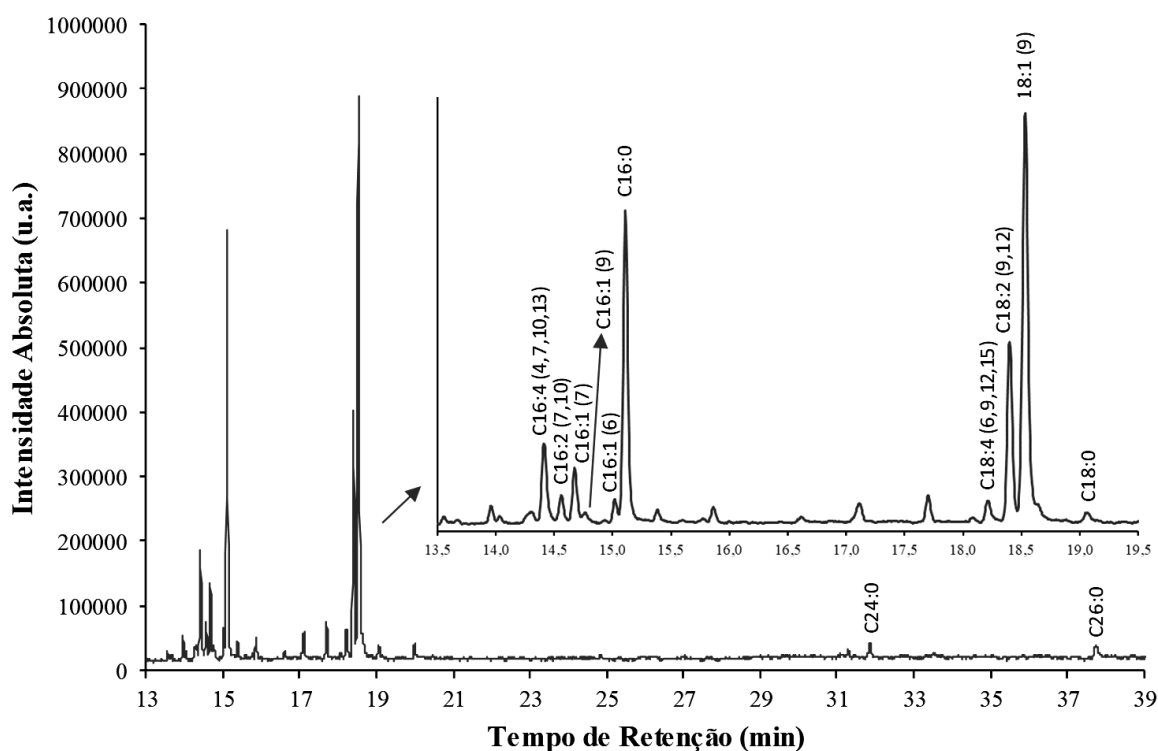
As análises estatísticas realizadas (TABELA 4) demonstraram não haver diferenças significativas entres os métodos de secagem aplicados (Teste-t de Student, $p > 0,05$), mais sim entre componentes quantificados na biomassa da microalga *M. decolor* (*one-way* ANOVA, $p < 0,05$).

5.1.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA

As biomassas secas da microalga *M. decolor*, tanto em liofilizador quanto em estufa a 35 °C, foram submetidas a um processo de saponificação, neutralização e esterificação (SNE) seguindo a metodologia proposta por Menezes *et al.* (2013) para

a conversão dos lipídeos extraídos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES, do inglês *fatty acid methyl esters*). Os ésteres metílicos extraídos com heptano de forma sequencial (4 repetições – vide seção 5.2.2) foram submetidos à análise por GC-MS visando caracterizar o perfil de ácidos graxos presentes na fração lipídica da microalga. O cromatograma com os respectivos picos referentes aos principais ácidos graxos identificados na amostra pode ser observado na FIGURA 6.

FIGURA 6 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA PRIMEIRA FRAÇÃO HEPTÂNICA DA MICROALGA *M. decolor* SECA EM LIOFILIZADOR, ANALISADA POR CROMATOGRAFIA A GÁS NA FORMA DE ÉSTERES METÍLICOS.



Fonte: O autor (2019).

A identificação de cada analito foi realizada pela avaliação dos seus tempos de retenção e pelos seus respectivos espectros de massas, que foram comparados ao desempenho de padrões verdadeiros e com os dados disponíveis na biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) do equipamento. O perfil

lipídico foi determinado por normalização de área e apresentado como a média de análises realizadas em triplicada, acompanhada de seu respectivo desvio padrão.

As TABELA 5 e TABELA 6 apresentam os perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostras de *M. decolor* secas em estufa ou em liofilizador. Os cromatogramas indicam a presença dos mesmos ésteres metílicos em ambos os perfis, independentemente do método empregado para secagem da amostra. No entanto, algumas variações foram observadas na quantificação dos ésteres, revelando diferenças de 14,5% para o ácido palmítico, de 13,5% para o ácido linoleico e de 7,6% para o ácido oleico.

TABELA 5 – PERFIL DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO HEPTÂNICA CAPTURADA NA ESTERIFICAÇÃO DA BIOMASSA DE *M. decolor* SECA EM LIOFILIZADOR.

t_R (min)	Ácido graxo	Nome sistemático	Notação taquigráfica	Área %
14,30	Hexadecatrienoico	4,7,10-hexadecatrienóico	C16:3 (4,7,10)	1,37±0,40
14,42	Hexadecatetraenoico	4,7,10,13-hexadecatetraenóico	C16:4 (4,7,10,13)	6,75±0,33
14,56	Hexadecadienóico	7,10-hexadecadienóico	C16:2 (7,10)	2,44±0,08
14,68	Hexadecenóico	7-hexadecenóico	C16:1 (7)	4,56±0,30
14,77	Palmitoleico	9-hexadecenóico	C16:1 (9)	1,37±0,25
15,03	Hexadecenóico	6-hexadecenóico	C16:1 (6)	1,77±0,25
15,11	Palmítico	hexadecanóico	C16:0	25,03±2,57
18,22	Octadecatrienóico	6,9,12,15-octadecatetraenóico	C18:4 (6,9,12,15)	2,03±0,17
18,41	Linoleico	9,12-octadecadienóico	C18:2 (9,12)	13,74±1,15
18,54	Oleico	9-octadecenóico	C18:1 (9)	38,52±2,96
19,07	Esteárico	octadecanóico	C18:0	0,81±0,25
31,85	Lignocérico	tetracosanóico	C24:0	0,51±0,82
37,76	Cerótico	hexacosanóico	C26:0	1,09±0,91

FONTE: O autor (2019)

Os principais ácidos graxos constituintes do perfil cromatográfico da microalga *M. decolor* foram os ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2) e

4,7,10,13 hexadecatetraenoato (C16:4). Essa composição é semelhante ao descrito por Del Río *et al.* (2015) em estudos realizados com a mesma espécie. Já se comparado a oleaginosas presentes na matriz energética brasileira para a produção de biodiesel, percebe-se uma certa semelhança com o óleo de palma, cujos ésteres majoritários correspondem aos ácidos oleico (43,26%), palmítico (40,59%) e linoleico (9,72%; SANTOS *et al.*, 2019).

TABELA 6 – PERFIL DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO HEPTÂNICA CAPTURADA NA ESTERIFICAÇÃO DA BIOMASSA DE *M. decolor* SECA EM ESTUFA DE CIRCULAÇÃO DE AR (35°C).

t_R (min)	Ácido graxo	Nome sistemático	Notação taquigráfica	Área (%)
14,32	Hexadecatrienoico	4,7,10-hexadecatrienóico	C16:3 (4,7,10)	0,44±0,31
14,41	Hexadecatetraenoico	4,7,10,13-hexadecatetraenóico	C16:4 (4,7,10,13)	4,51±0,09
14,56	Hexadecadienóico	7,10 hexadecadienóico	C16:2 (7,10)	1,71±0,01
14,67	Hexadecenóico	7-hexadecenóico	C16:1 (7)	4,27±0,12
14,76	Palmitoleico	9-hexadecenóico	C16:1 (9)	0,92±0,07
15,02	Hexadecenóico	6-hexadecenóico	C16:1 (6)	1,16±0,06
15,11	Palmítico	hexadecanóico	C16:0	29,3±0,28
18,21	Octadecatrienóico	6,9,12,15-octadecatetraenóico	C18:4 (6,9,12,15)	1,45±0,04
18,40	Linoleico	9,12-octadecadienóico	C18:2 (9,12)	11,88±0,15
18,53	Oleico	9-octadecenóico	C18:1 (9)	41,73±1,44
19,06	Esteárico	octadecanóico	C18:0	1,58±0,05
31,86	Lignocérico	tetracosanóico	C24:0	0,43±0,42
37,76	Cerótico	hexacosanóico	C26:0	0,62±0,74

FONTE: O autor (2019)

O ácido oleico ou 9-octadecenóico (C18:1) foi o mais abundante dentre os componentes do perfil graxo de *M. decolor*, tendo áreas percentuais de 38,52±2,96% para a biomassa liofilizada e 41,73±1,44% para a seca em estufa. Esse ácido graxo monoinsaturado é importante na saúde humana, especialmente pela redução da pressão arterial sistólica, auxiliando no tratamento de distúrbios metabólicos, lesões

de pele e câncer, inibição na agregação plaquetária e redução do colesterol sérico (LDL) (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013; KARACOR; CAM, 2015).

O segundo componente mais dominante nas amostras analisadas foi o ácido palmítico ou hexadecanóico (C16:0), que apresentou uma área percentual de $25,03 \pm 2,57\%$ na biomassa liofilizada e de $29,3 \pm 0,28\%$ na seca em estufa a 35 °C. Várias aplicações já foram encontradas para o C16:0, tais como inibição do HIV-1 (LIN *et al.*, 2011), atividade antitumoral (HARADA *et al.*, 2002), agente de intumescimento na fabricação de borracha natural (WEE *et al.*, 2017) e matéria-prima ou intermediário para plastificantes e surfactantes (CHEN *et al.*, 2015).

O ácido linoleico ou 9,12-octadecadienóico (C18:2) é o terceiro maior componente do conteúdo graxo de *M. decolor*. Pertencente à família dos ômegas, este ácido tem importante participação na dieta humana, apresentando propriedades anti-inflamatórias, redutoras de acne e clareadoras da pele (LETAWE *et al.*, 1998; ANDO *et al.*, 1998), assim como efeitos protetores contra o câncer, obesidade, diabetes e aterosclerose (YANG *et al.*, 2015).

Artigos científicos sobre a composição graxa da clorofícea *M. decolor* são extremamente escassos na literatura. Neste contexto, Del Río *et al.* (2015) avaliaram o perfil graxo de *M. decolor* cultivada em diferentes meios e observaram a ocorrência de variação no seu perfil de ácidos graxos. Em média, os ácidos C16:0 (25,1%), C18:1 (42,3%), C18:2 (5,9%) e C18:3 (1,3%) foram identificados como componentes majoritários do perfil. A soma dos ésteres C16:0 e C18:1 representou mais de 60% do teor de ácidos graxos totais para *M. decolor* cultivada em meio sob limitação de nitrato, contra apenas 20-30% em meio controle contendo nitrogênio. Esses dados confirmam os encontrados no presente estudo, onde esses mesmos ácidos graxos compuseram mais de 70% do perfil, sendo 77,29% na biomassa seca

em liofilizador e de 88,83% na seca em estufa de circulação forçada (35 °C). Dentre os ácidos graxos identificados por Del Río *et al.* (2015), apenas os ácidos C16:4 (hexadecatetraenóico) e C18:3 (linolênico) não fazem parte da composição graxa da biomassa de *M. decolor* utilizada no presente estudo.

5.2 EXTRAÇÃO EM SOXHLET

5.2.1 Rendimento bruto de extrato lipídico

A extração dos lipídeos da microalga estudada foi realizada utilizando quatro tipos de solventes em extrator Soxhlet: etanol, hexano, clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e hexano:etanol (2:1). No geral, solventes apolares como o hexano extraem lipídeos neutros e outros componentes de baixa polaridade como pigmentos carotenoides, enquanto solventes polares como o etanol fornecem maiores rendimentos mássicos de extração por solubilizar uma ampla faixa de compostos lipídicos polares. Por ser um solvente polar, o etanol vai interagir diretamente com lipídeos da parede celular (fosfolipídeos e glicolipídeos) e outros metabólitos polares como ácidos graxos, pigmentos, carotenoides e lipídeos complexos, além de lipídeos neutros como triacilglicerídeos. A partir das extrações em Soxhlet, o etanol foi o solvente que proporcionou o maior Rendimento Bruto do Extrato Lipídico (RBEL) da biomassa seca de *M. decolor*, independentemente do método empregado para secagem da amostra. Em segundo lugar ficou a mistura de clorofórmio:metanol (2:1), que diferiu em 11% das extrações realizadas com etanol (TABELA 7).

Ao analisar os dados estatisticamente foi percebido que não houve diferença significativa entre os métodos de secagem da biomassa ($p>0,05$), mais sim entre os métodos de extração ($p<0,05$) do material lipídico da microalga *M. decolor*, o que já era de se esperar devido ao uso de diferentes processos de extração.

Balasubramanian *et al.* (2013) também observaram que não houve um efeito significativo entre métodos de secagem estudados como liofilização, secagem em estufa e aquecimento solar sobre o rendimento da extração lipídica ($p>0,05$) da biomassa da microalga *Nannochloropsis* sp.

TABELA 7 – RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) DA BIOMASSA SECA DE *M. decolor* A PARTIR DE DIFERENTES METODOLOGIAS E SOLVENTES.

Método extrativo	Solvente	RBEL (g/100 g)	
		Liofilizador	Estufa
Soxhlet	Etanol ^a	30,82±3,65	28,58±0,86
	Hexano ^b	11,60±0,08	12,71±0,22
	Hexano:etanol (2:1, v/v) ^c	21,18±0,61	19,38±0,78
	Clorofórmio:metanol (2:1, v/v) ^c	24,97±0,24	25,37±0,31
Bligh; Dyer (1959)	Clorofórmio:metanol (2:1, v/v) ^c	17,03±0,12	18,10±0,16

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As letras a, b e c representam a análise estatística de cada variável dentre os solventes utilizados. Valores marcados com letras iguais não diferem significativamente entre si (*one-way* ANOVA, $p>0,05$).

A análise dos dados obtidos para *M. decolor* por meio de uma *one-way* ANOVA revelou que o rendimento lipídico diferiu significativamente entre os solventes utilizados para extração ($p<0,05$). Por outro lado, o teste *a posteriori* de Tukey demonstrou que parte das diferenças observadas foi significativa. Apenas os rendimentos obtidos com as misturas de hexano:etanol 2:1 (v/v) e clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) não diferiram entre si ($p>0,05$).

No estudo desenvolvido por Baumgardt *et al.* (2016) foi observado que o etanol anidro teve o melhor desempenho de extração e o maior rendimento de óleo (19,2 g/100g de biomassa seca) a partir da microalga *Nannochloropsis oculata*, seguido pela mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) (18,1 g/100 g de biomassa seca) e hexano (4,8 g/100 g de biomassa seca).

Da Cruz Lima *et al.* (2018) verificaram em seu trabalho que, para a biomassa de *C. minor* var. *minor* seca em estufa, os melhores rendimentos de óleo nas extrações convencionais foram alcançados utilizando o clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) ($30,9 \pm 2\%$) e o etanol ($30,5 \pm 1,9\%$). Comparativamente a esses resultados, o uso de hexano gerou uma redução de 65% no rendimento de extrato lipídico bruto ($10,6 \pm 0,7\%$).

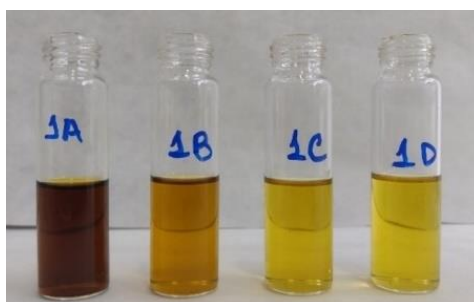
5.2.2 Perfil Graxo e Rendimento Bruto de Esterificação Metílica (RBEM)

Os extratos lipídicos obtidos pelos métodos de extração convencional foram convertidos a ésteres metílicos de ácidos graxos segundo a metodologia proposta por Menezes *et al.* (2013). Como não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de secagem (seção 5.1.1 e 5.2.1), tais experimentos foram realizados apenas com a biomassa seca em estufa a 35°C , até mesmo por ser esse um método de secagem mais barato e mais acessível para uso em laboratório.

No procedimento proposto por Menezes *et al.* (2013), a recuperação dos ésteres metílicos sintetizados a partir da biomassa ou de seu extrato lipídico é feita por extração com heptano. No entanto, dada a heterogeneidade desse meio de reação, a partição com heptano foi realizada quatro vezes consecutivas para garantir a extração exaustiva dos ésteres, aumentando assim a representatividade dos resultados experimentais. Tomando como referência o extrato etanólico (TABELA 8), percebe-se que houve uma redução gradual do Rendimento Bruto de Esterificação Metílica (RBEM) entre as frações heptânicas recuperadas no processo (FIGURA 7), sendo que do rendimento total extraído, 77% foi recuperado na primeira, 18% na segunda e 5% na terceira fração. Como podemos observar através da FIGURA 7 a quarta fração ainda apresentava coloração amarela, provavelmente devido aos altos

níveis de luteína presentes na biomassa. O gênero *Muriella* é conhecido por apresentar altos níveis produtivos deste pigmento, que gira em torno de 0,5–2,55 gramas de luteína por kilo de biomassa (DEL CAMPO *et al.*, 2000), sendo um possível concorrente no mercado atual de luteína, que tem como principal fonte flores de calêndula (LIN *et al.*, 2015). No entanto, as análises cromatográficas demonstraram que não havia mais ésteres metílicos nessa fração. A partir desta observação, cada ensaio realizado foi submetido a três lavagens heptânicas e os extratos foram reunidos em um mesmo recipiente. Os valores de RBEM foram determinados gravimetricamente após a evaporação do solvente (TABELA 8) e parte do extrato foi redissolvido em heptano para análise por GC-MS, visando determinar o seu perfil em ácidos graxos (TABELA 9). Os cromatogramas referentes aos principais ácidos graxos identificados nos extratos encontram-se registrados no APÊNDICE (FIGURAS de A a E).

FIGURA 7 – FRAÇÕES HEPTÂNICAS SEQUENCIAIS RESULTANTES DA REAÇÃO PROPOSTA POR MENEZES *et al.* (2013), DEMONSTRANDO A DIFERENÇA VISUAL ENTRE A COLORAÇÃO DOS EXTRATOS.



Fonte: O autor (2019).

A partir das frações heptânicas capturadas no ensaio (TABELA 8), o maior rendimento bruto de esterificação metílica (RBEM) foi obtido a partir das extrações realizadas com hexano:etanol (2:1, v/v) seguidas das realizadas em etanol, enquanto que o maior rendimento bruto do extrato lipídico (RBEL) foi observado

para as extrações realizadas com a mistura de etanol. Os menores valores de RBEL e RBEM (extrato bruto esterificado) foram observados para o hexano.

TABELA 8 – RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) E RENDIMENTO BRUTO DE ESTERIFICAÇÃO METÍLICA (RBEM) DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DA BIOMASSA DE *M. decolor* SECA EM ESTUFA, USANDO DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.

Método	Solvente	RBEL (g/100 g)	RBEM (g/100 g)	Conversão
<i>In situ</i>	—	—	12,40±0,13	—
Soxhlet	Etanol	28,58±0,86	13,61±0,76	47,62%
	Hexano	12,71±0,22	10,45±0,17	82,21%
	Hexano:etanol (2:1, v/v)	19,38±0,78	13,82±0,48	71,31%
	Clorofórmio:metanol (2:1, v/v)	25,37±0,31	12,08±0,37	47,61%
Bligh; Dyer (1959)	Clorofórmio:metanol (2:1, v/v)	18,10±0,16	12,14±0,10	67,07%

FONTE: O autor (2019).

TABELA 9 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS DA BIOMASSA SECA DE *M. decolor* ATRAVÉS DE DIFERENTES SOLVENTES E METODOLOGIAS.

FAMES	Percentual (%) de FAME em diferentes métodos de extração				
	Etanol	Hexano	Clorofórmio: metanol (2:1)	Hexano:etanol (2:1)	Bligh; Dyer (1959)
C16:3 (4,7,10)	0,68±0,20	1,06±0,13	1,05±0,07	1,03±0,06	1,02±0,08
C16:4 (4,7,10,13)	3,88±0,07	5,11±0,88	5,86±0,19	5,71±0,38	5,17±0,34
C16:2 (7,10)	1,38±0,04	1,57±0,22	1,75±0,09	1,72±0,18	1,64±0,11
C16:1 (7)	3,37±0,03	3,91±0,37	4,12±0,10	4,09±0,28	4,07±0,26
C16:1 (9)	0,65±0,03	0,79±0,05	0,9±0,03	0,88±0,09	0,88±0,07
C16:1 (6)	1,06±0,12	1,39±0,03	1,17±0,08	1,27±0,06	1,29±0,08
C16:0	29,41±0,75	23,61±0,58	31,94±0,28	27,08±0,84	29,38±2,80
C18:4 (6,9,12,15)	1,70±0,11	2,11±0,06	1,84±0,27	2,33±0,04	2,09±0,20
C18:2 (9,12)	11,23±0,27	13,5±0,56	11,92±0,10	12,87±0,33	13,09±0,36
C18:1 (9)	41,23±0,26	40,43±0,31	34,83±0,34	37,08±0,73	36,72±1,54
C18:0	1,59±0,09	1,77±0,18	1,45±0,05	2,03±0,37	1,73±0,08
C24:0	1,52±0,25	1,57±0,12	1,27 ±0,09	1,47±0,38	1,5±0,72
C26:0	2,31±0,43	3,18±0,17	1,91±0,25	2,47±0,68	1,41±0,16

FONTE: O autor (2019).

Quando comparadas as taxas percentuais de conversão do material graxo (TABELA 8), observa-se que todos os valores margearam o encontrado para a

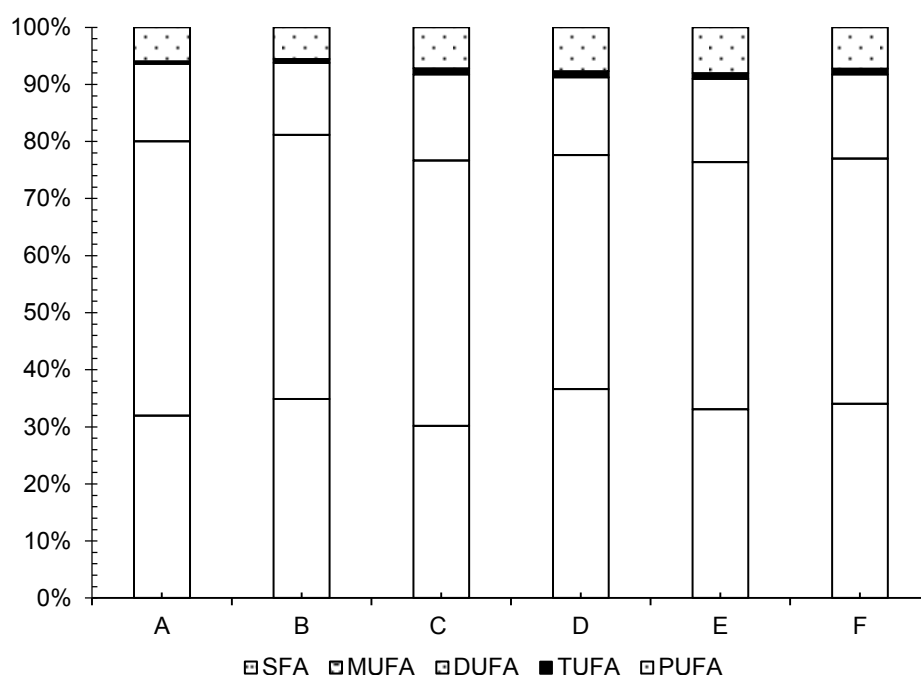
reação *in situ*. A maior taxa de conversão foi observada para os extratos realizados com hexano (82%), seguida pelos 71% obtidos a partir da mistura hexano:etanol (2:1, v/v). A seletividade em relação ao material graxo extraído se dá a partir da polaridade apresentada por cada solvente utilizado, de onde é possível inferir quais seriam os melhores solventes extratores. A partir de sua apolaridade, o hexano interage diretamente com os triacilglicerídeos (material de reserva) presentes no interior das células, além de ácidos graxos livres e outras qualidades de lipídeos neutros ou pouco polares. Já o etanol, por apresentar polaridade, interage majoritariamente com moléculas lipídicas mais polares como fosfolipídeos ou glicolipídeos presentes na parede celular. Assim, a mistura desses solventes acarreta em uma polaridade intermediária, onde a possibilidade de interação com diferentes metabólitos graxos resulta em melhores rendimentos de extração (HALIM *et al.*, 2012; ESCORSIM *et al.*, 2018).

O hexano demonstrou ser um bom solvente de trabalho, pois levou a uma maior seletividade para lipídeos esterificáveis, neutros ou de baixa polaridade, descartando futuras dificuldades e gastos intensivos com processos de purificação dos ésteres de ácidos graxos a serem utilizados como biodiesel. Além disso, esse solvente apresenta baixo ponto de ebulição e pode ser manuseado com segurança em processos industriais, apesar de sua toxicidade.

O perfil graxo de uma matriz oleaginosa pode ser expresso em relação ao seu grau de saturação (FIGURA 8), cujos valores estão relacionados à presença de ácidos graxos saturados (SFA, do inglês *saturated fatty acids*), mono-insaturados (MUFA, do inglês *monounsaturated fatty acids*), di-insaturados (DUFA, do inglês *di-unsaturated fatty acids*) tri-insaturados (TUFA, do inglês *tri-unsaturated fatty acids*) e poli-insaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*). Tais dados são de

extrema importância para que o seu potencial seja avaliado para a produção de biocombustíveis, fármacos, biopolímeros e ração animal, dentre outros. O perfil graxo de *M. decolor* mostrou-se majoritariamente composto por MUFAs, que apresentaram maior concentração nos extratos obtidos com etanol (46,30%) e hexano (46,51%), seguidos por SFAs, que responderam por 30 a 36% dos ésteres presentes em cada um dos extratos.

FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA BIOMASSA IN NATURA E NOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS DA MICROALGA *M. decolor*, DE ACORDO COM O GRAU DE SATURAÇÃO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A) Biomassa *in natura*; B) etanol; C) hexano; D) clorofórmio:metanol (2:1); E) hexano:etanol (2:1); F) método de extração baseado em Bligh; Dyer (1959).

Com base nos resultados obtidos podemos observar que a secagem em estufa se demonstrou efetiva, acessível e mais barata comparado a liofilização. A biomassa de *M. decolor* apresenta altos teores de proteínas (20,9%), lipídeo (14%) e carboidratos (12,4%) em sua composição. O seu perfil graxo é composto

majoritariamente por ácido oleico (41,7%); palmítico (29,3%) e linoleico (11,8%), tendo maiores concentrações graxas de ácidos monoinsaturados e saturados. Entre os solventes o etanol demonstrou melhores rendimentos de extração, apesar de ter os menores rendimentos de extração o hexano demonstrou melhores conversões do material extraído.

5.3 EXTRAÇÕES EM SISTEMA COM FLUIDO PRESSURIZADO

5.3.1 Rendimentos e cinética de extração

A partir das melhores condições observadas por Da Cruz Lima *et al.* (2018) em seu trabalho com *C. minor* var. *minor*, utilizando o mesmo sistema de extração, optou-se por selecionar os gases propano e dióxido de carbono para as extrações com fluidos pressurizados que, nas condições descritas na TABELA 10, apresentam-se em estados subcrítico e supercrítico, respectivamente. Após secagem, a biomassa foi triturada e peneirada, sendo que 82,34% (0,5 mm) do material ficou retido na peneira de 35 mesh.

A extração em sistemas pressurizados proporcionou excelentes rendimentos brutos do extrato lipídico (RBEL), sendo que o propano se sobressaiu como melhor solvente extrator. Seu rendimento de extração foi 47% superior ao obtido a partir das extrações realizadas com CO₂ supercrítico (sc-CO₂).

Da Cruz Lima *et al.* (2018) observaram em seus estudos que, para a biomassa seca em estufa da microalga *C. minor* var. *minor*, o melhor rendimento de extração foi alcançado para as amostras extraídas utilizando-se propano como solvente extrator (10,8%). Esse valor foi bem próximo ao encontrado para a *M. decolor* no presente trabalho. Por outro lado, a extração com sc-CO₂ da biomassa de

C. minor var. *minor* forneceu RBEL máximos de 7,3% em 170 min de extração, ou seja, cerca de 30% a menos do que encontrado para *M. decolor* nesse estudo.

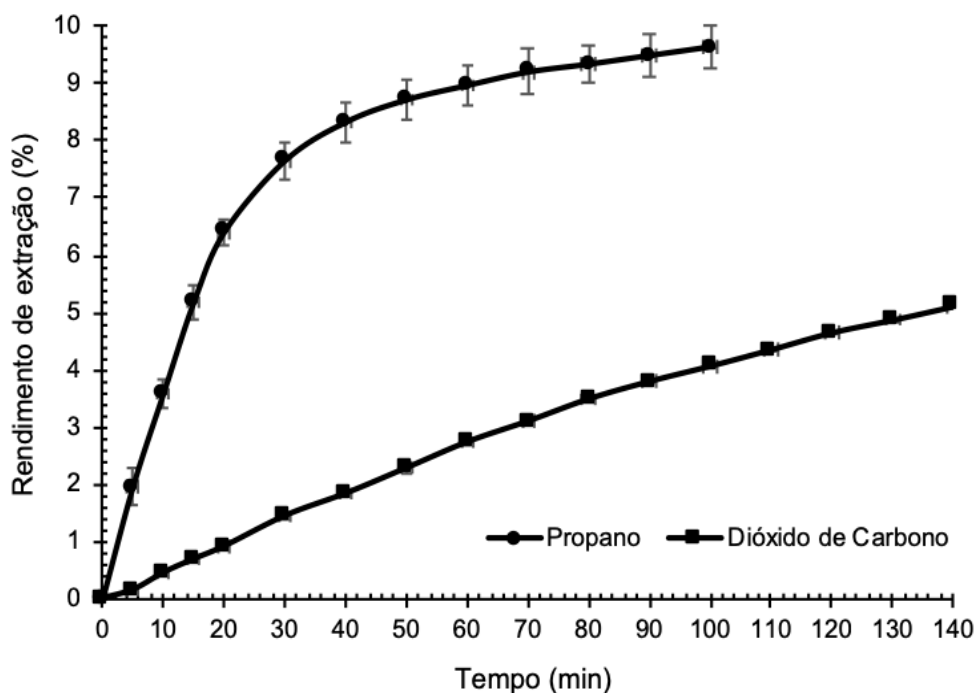
TABELA 10 – CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) OBTIDO A PARTIR DAS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM FLUÍDOS PRESSURIZADOS.

Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	RBEL (g/100 g)
Propano subcrítico	100	80	9,64±0,43
CO ₂ supercrítico (sc-CO ₂)	250		5,11±0,05

FONTE: O autor (2019).

Ao analisar as curvas cinéticas da extração com fluidos pressurizados (FIGURA 9), pode-se entender a influência dos parâmetros testados (pressão e temperatura) sobre o comportamento extrativo dos solutos de interesse. A curva cinética de extração divide-se em três partes distintas (CER – Taxa de extração constante, do inglês *Constant Extraction Rate*; FER – Taxa de extração decrescente, do inglês *Falling Extraction Rate*; DCR – Taxa controlada por difusão, do inglês *Diffusion Controlled Rate*) e de fácil identificação. Na primeira (CER), boa parte do soluto presente no material (40-50%) é extraída de forma constante por convecção do solvente sobre as partículas. A segunda fase (FER) é caracterizada pelo decréscimo da quantidade de soluto extraído por unidade de tempo, sendo responsável pela recuperação de aproximadamente 20% do soluto inicialmente presente na amostra. Essas duas fases compreendem cerca de 70% do extrato lipídico total presente no material. Por último, a fase DCR se caracteriza por atingir o equilíbrio do processo extrativo, em que pequenas quantidades de extrato ainda são obtidas pela difusão lenta e gradativa do solvente no material a ser extraído (CZAIKOSKI *et al.*, 2015; VALADEZ-CARMONA *et al.*, 2018).

FIGURA 9 – CURVAS REPRESENTANDO A CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Muriella decolor* UTILIZANDO PROPANO SUBCRÍTICO E CO₂ SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTES EXTRATORES.



FONTE: O autor (2019).

A cinética de extração do material graxo de *M. decolor* com propano subcrítico gerou melhores resultados que os experimentos realizados com sc-CO₂ (FIGURA 9). Com propano subcrítico, o rendimento alcançado foi de 9,64% em 100 min de extração a uma temperatura de 80°C e pressão de 100 bar. A curva cinética desse processo de extração ainda permitiu observar claramente as três fases de extração descritas anteriormente (CER, FER e DCR). Por outro lado, nas extrações com sc-CO₂ apenas a fase CER foi observada, sendo perceptível a recuperação contínua de componentes lipídicos mesmo após 140 min de extração.

5.3.2 Perfil Graxo e Rendimento Bruto de Esterificação Metílica (RBEM)

Os resultados de perfil graxo da microalga *M. decolor*, traçados a partir da fração heptânica dos extratos esterificados derivados da extração com fluidos

pressurizados, encontram-se registrados na TABELA 11. Os cromatogramas referentes aos principais ácidos graxos identificados nos extratos obtidos com fluidos pressurizados podem ser observados no APÊNDICE (FIGURAS F e G). Comparados aos perfis derivados da extração convencional, pode-se averiguar a ocorrência de variações mínimas nos ésteres metílicos identificados e a presença de outros ésteres antes não observados, como os ácidos mirístico (C14:0) e nervônico [C24:1 (15)], ainda que em concentrações residuais.

TABELA 11 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA DE *M. decolor* OBTIDOS COM FLUIDOS PRESSURIZADOS.

FAMES	Percentual (%) de FAMES em diferentes solventes	
	Propano subcrítico	CO ₂ supercrítico
C14:0	0,33±0,01	0,31±0,07
C16:3 (4,7,10)	1,81±0,06	1,9±0,15
C16:4 (4,7,10,13)	8,41±0,31	9,32±0,13
C16:2 (7,10)	2,35±0,06	2,68±0,03
C16:1 (7)	4,41±0,14	5,26±0,04
C16:1 (9)	0,95±0,03	1,02±0,01
C16:1 (6)	2,45±0,07	2,56±0,07
C16:0	15,76±0,46	16,12±0,39
C18:3 (6,9,12)	0,56±0,01	0,61±0,01
C18:4 (6,9,12,15)	2,72±0,10	2,92±0,04
C18:2 (9,12)	15,54±0,45	15,65±0,34
C18:1 (9)	37,83±1,83	37,52±1,63
C18:0	0,81±0,08	0,77±0,06
C24:1 (15)	0,87±0,09	0,52±0,04
C24:0	1,54±0,07	0,94±0,11
C26:0	3,67±0,25	1,93±0,16

FONTE: O autor (2019).

Os dois fluidos pressurizados apresentaram uma excelente seletividade para a extração de material graxo intracelular saponificável da *M. decolor*, já que 75,16% e 68,01% dos extratos brutos em propano subcrítico e sc-CO₂ foram convertidos a

ésteres metílicos empregando a técnica de SNE descrita na seção 4.4.1 (TABELA 12). No entanto, o extrato propânico apresentou rendimentos finais em éster duas vezes maior do que os obtidos com CO₂.

TABELA 12 – RENDIMENTO BRUTO DO EXTRATO LIPÍDICO (RBEL) E RENDIMENTO BRUTO DE ESTERIFICAÇÃO METÍLICA (RBEM) DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA DE *M. decolor* EMPREGANDO DIFERENTES FLUIDOS PRESSURIZADOS.

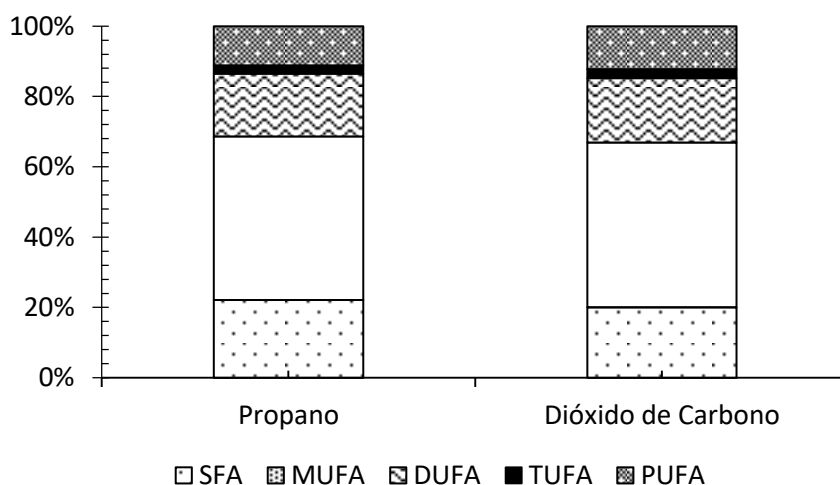
Solvente	RBEL (g/100 g)	RBEM (g/100 g)	Conversão
Propano	9,64±0,43	7,24±0,22	75,10%
sc-CO ₂	5,11±0,05	3,49±0,08	68,29%

FONTE: O autor (2019).

Quando comparadas às extrações convencionais, os fluidos pressurizados apresentaram rendimentos de extração menores nas condições de pressão e temperatura testadas nesse estudo. Suas propriedades sub ou supercríticas não foram capazes de maximizar os rendimentos, de forma a superar o desempenho dos solventes orgânicos. Vale ressaltar que, a partir do caráter não polar do gás propano, foi possível obter um processo de extração mais seletivo para moléculas graxas esterificáveis (75% de conversão; TABELA 12), assim como fora anteriormente observado para as extrações realizadas com hexano (82% de conversão; TABELA 8).

O perfil graxo a partir do grau de saturação (FIGURA 10) demonstra novamente que os extratos lipídicos são compostos majoritariamente por MUFAs (46%), independentemente do solvente extrator utilizado. E, repetindo a tendência observada anteriormente, o segundo maior componente dos extratos foram os SFAs, que representaram 20 a 22% dos ácidos graxos presentes nas amostras submetidas à análise.

FIGURA 10 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR GRAU DE SATURAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS COM FLUIDOS PRESSURIZADOS DA BIOMASSA DA MICROALGA *M. decolor*.



FONTE: O autor (2019).

5.4 RENDIMENTO MÁSSICO EM ÉSTERES METÁLICOS

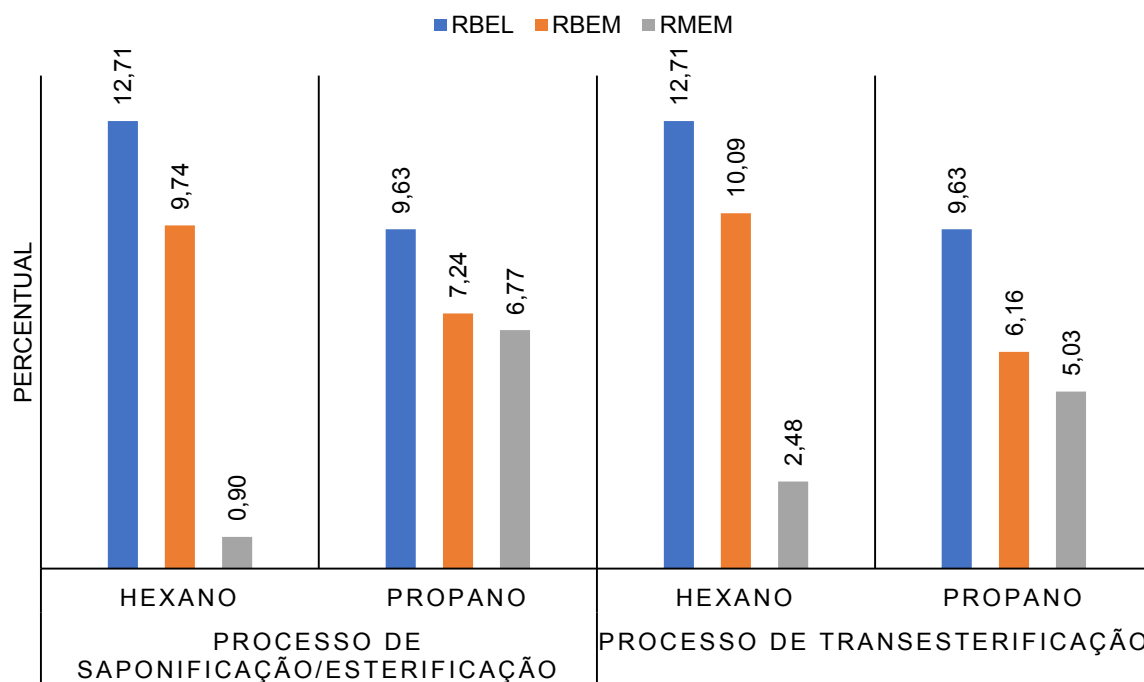
Por ser derivado do extrato heptânico de um processo de esterificação e/ou transesterificação, o rendimento bruto de esterificação metílica (RBEM), seja da microalga *M. decolor* ou de qualquer outra matriz, é comumente associado ao potencial da matéria-prima para a produção de biodiesel, principalmente pela solubilidade dos FAMES nesse solvente orgânico. No entanto, o teor de ésteres totais desses extratos heptânicos e o rendimento mássico em ésteres metílicos, em relação à biomassa de microalgas (base seca), somente poderia ser conhecido mediante análises quantitativas.

A partir de suas propriedades seletivas para a extração de lipídeos de baixa polaridade e melhores resultados nos testes iniciais de conversão (Tabelas 8 e 12), os extratos obtidos em hexano e propano subcrítico foram convertidos a ésteres metílicos empregando a técnica de transesterificação ácida desenvolvida por D'Oca *et al.* (2011). Posteriormente, a fração de ésteres foi quantificada por padronização externa a partir de análises por GC-MS (itens 4.4.2 e 4.4.3), de forma a determinar o

Rendimento Mássico em Ésteres Metílicos (RMEM) nessas frações de maior interesse para aplicação em motores do ciclo diesel (biodiesel).

Independente da metodologia empregada para o processo de conversão, pode-se observar que os lipídios de *M. decolor* foram convertidos a FAMEs em diferentes rendimentos mássicos (FIGURA 11). De acordo com o teor de ésteres (RMEM), o processo de SNE converteu um total de 7,1% do extrato lipídico derivado do emprego de hexano em Soxhlet, menor concentração de ésteres. Já os extratos oriundos das extrações com propano subcrítico resultaram em uma conversão de 70,3% em ésteres do material extraído. De sua totalidade, 22,10% dos ésteres produzidos foram derivados de ácidos graxos saturados, 46,51% de mono-insaturados, 17,89% de di-insaturados e 13,5% de poli-insaturados (TABELA 11).

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DOS RENDIMENTOS MÁSSICOS OBTIDOS A PARTIR DOS EXTRATOS DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA DE *M. decolor*, EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES EXTRATORES E MÉTODOS DE CONVERSÃO DO EXTRATO LIPÍDICO EM ÉSTERES METÍLICOS.



FONTE: O autor (2019).

Legenda: RBEL, Rendimento Bruto do Extrato Lipídico; RBEM, Rendimento Bruto de Esterificação Metílica; RMEM, Rendimento Mássico em Ésteres Metílicos.

O processo de transesterificação ácida foi aplicado no extrato hexânico do aparelho Soxhlet e no extrato lipídico obtido por extração subcrítica com propano, os valores de conversão em FAMES dos extratos lipídicos obtidos com hexano e propano subcrítico foram, 19,5% e 52,2%, respectivamente (FIGURA 11). A diferença dos valores de RMEM entre as duas metodologias de síntese foi de 12,4% entre os extratos hexânicos e de 18,1% para o extrato propânico.

Independente da metodologia de conversão dos lipídeos, os extratos de *M. decolor* com hexano apresentaram altas taxas de material bruto esterificado e baixos níveis de ésteres graxos sintetizados. Em contraste, nos FAMES obtidos após os processos de saponificação-esterificação e transesterificação ácida de extratos lipídicos utilizando propano subcrítico foram observados maiores teores de ésteres graxos, destacando o potencial extrativo do propano subcrítico.

A partir da conversão do material graxo em ésteres ainda foi possível observar por diferença percentual a presença de outros compostos na fração esterificada, a verificação da qualidade do produto por transesterificação ácida foi realizada através de análises de RMN de ^1H (FIGURA 12 e 13).

A partir da conversão do material graxo em ésteres ainda foi possível observar por diferença percentual a presença de outros compostos na fração esterificada, a verificação da qualidade do produto por transesterificação ácida foi realizada através de análises de RMN de ^1H (FIGURA 12 e 13).

As análises de RMN de ^1H não mostraram sinais característicos dos hidrogênios (δ 4,0 e 4,5 ppm, CEDRÓN *et al*, 2014) referentes a presença triglicerídeos residuais nas amostras. Os sinais referentes aos hidrogênios dos ésteres metílicos graxos (FAMES) foram observados em todos os espectros

provenientes das diferentes frações lipídicas após a transesterificação. Nos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos FAMES brutos produzidos por processo de transesterificação ácida a partir de extrato lipídico de hexano usando o equipamento Soxhlet (FIGURA 12) foi observado um singlete em 3,66 ppm correspondente aos hidrogênios do grupo OCH_3 do éster metílico. No mesmo espectro em 5,36 ppm foram observados os hidrogênios vinílicos (CH) das ligações duplas, em 2,80 e 2,06 ppm foram observados os sinais correspondente aos hidrogênios alílicos ($-\text{CH}_2$) na cadeia e o tripleto a 2,29 ppm corresponde aos hidrogênios alfa ($-\text{CH}_2$) a carbonila do éster (LEMÕES *et al*, 2016; TORRES *et al*, 2017). Os sinais dos hidrogênios metililênicos da cadeia de carbônica foram observados entre 1,2-1,4 ppm (δ 1,26; MA *et al.*, 2019) e entre 0,86-0,97 os sinais dos hidrogênios referentes as metilas terminais ($-\text{CH}_3$) das cadeias saturadas e insaturadas (δ 0,98 e δ 0,88; MA *et al.*, 2019).

Na análise dos FAMES produzidos a partir do extrato de hexânico (FIGURA 12), além dos sinais dos ésteres graxos, também foram observados sinais típicos de pigmentos carotenoides, como a luteína ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$), nas regiões de 5,36 ppm, 1,62 ppm e em 0,86 ppm (WEI *et al.*, 2003). Apesar dos sinais dos carotenoides estarem em menor concentração estes foram detectados nos extratos hexânicos e propânicos. Além disto, qualitativamente de acordo com a integração relativa dos sinais nos espectros de RMN de ^1H é possível observar maiores quantidades de FAMES a partir do extrato subcrítico de propano (FIGURA 11), corroborando o encontrado nas análises de teor de éster por GC-MS.

FIGURA 12 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H (400 MHZ, CDCl_3) DOS FAMES BRUTOS PRODUZIDOS POR PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA A PARTIR DE EXTRATO LIPÍDICO DE HEXANO USANDO SOXHLET.

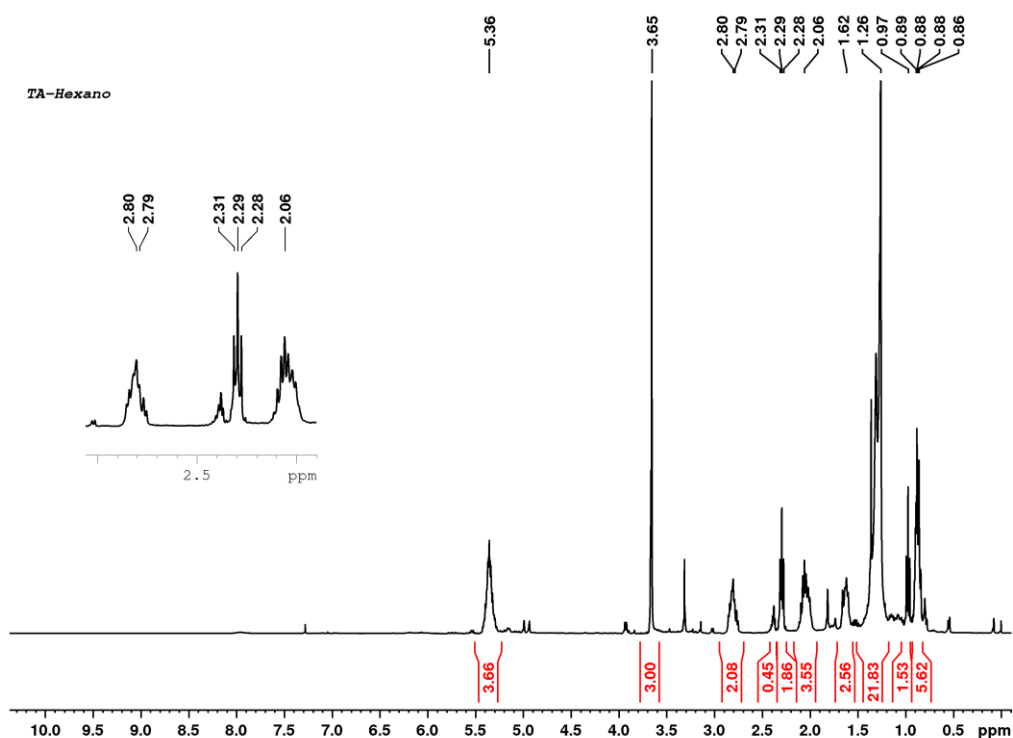
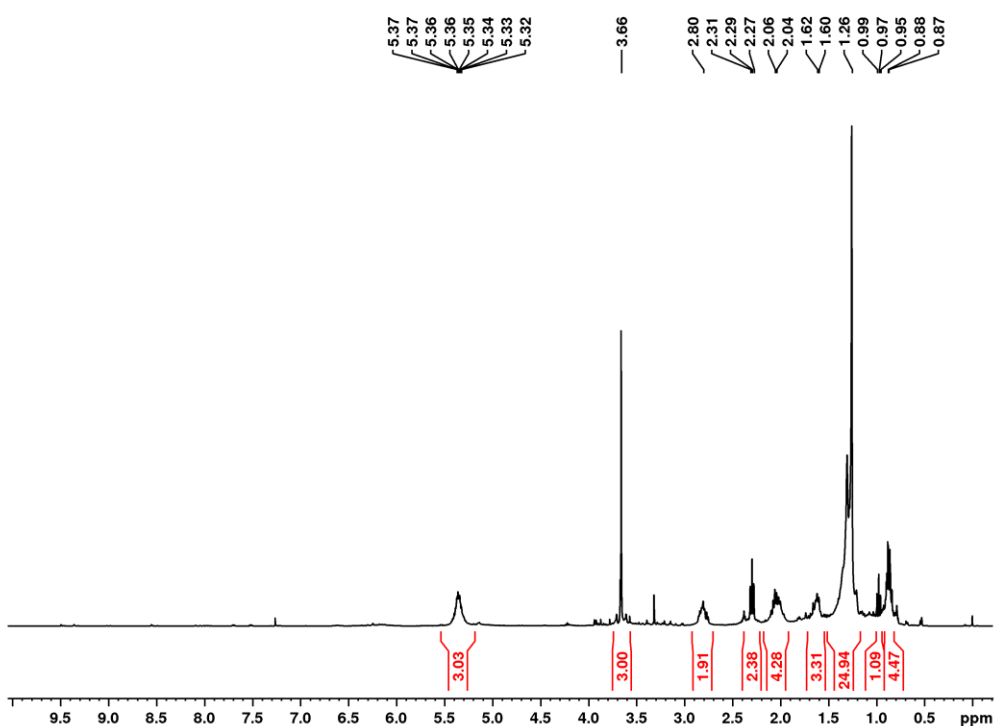


FIGURA 13 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H (400 MHZ, CDCl_3) DOS FAMES BRUTOS PRODUZIDOS POR PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA A PARTIR DO EXTRATO LIPÍDICO OBTIDO EM PROPANO SUBCRÍTICO.



A luteína é um carotenoide do grupo das xantofilas, molécula lipofílica e com alta hidrofobicidade, cuja ocorrência natural se dá como ésteres de ácidos graxos em que um ou dois dos grupos hidroxila presentes na molécula se encontram esterificados (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2007; STEINER *et al.*, 2018; BECERRA *et al.*, 2020). Assim, o processo de saponificação seguido de esterificação ou de transesterificação dos ésteres podem produzir carotenoides livres (luteína, etc.) e FAMES na presença de metanol (CHAN *et al.*, 2013; D'ALESSANDRO *et al.*, 2020).

5.5 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS DOS ÉSTERES

A produção laboratorial de microalgas é normalmente exploratória, sendo na maioria das vezes realizada em pequena escala empregando volumes de 250 mL a 5 L por cultivo (D'ALESSANDRO *et al.*, 2018; SASSI *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2018; NEVES *et al.*, 2019). Por consequência, a quantidade de biomassa adquirida por experimento é pouca e várias análises devem ser feitas de modo a caracterizar a sua composição centesimal. Por outro lado, a caracterização das propriedades combustíveis de amostras experimentais de biodiesel exige quantidades expressivas que se mostram muitas vezes inviáveis para estudos de bioenergia envolvendo microalgas. Para resolver essas limitações, equações preditivas foram desenvolvidas a partir do perfil de ácidos graxos de diferentes matrizes oleaginosas, incluindo as microalgas, e estas têm se demonstrado eficazes para prever algumas das principais propriedades de biocombustíveis como o biodiesel (RAMOS *et al.*, 2009; HOEKMAN *et al.*, 2012; TALEBI *et al.*, 2013; CALIXTO *et al.*, 2018).

Através da avaliação das propriedades combustíveis é possível estabelecer o enquadramento de um determinado produto nas especificações técnicas que regulam a sua comercialização em território nacional. No Brasil, a regulamentação

da produção e uso do biodiesel é regida pela Resolução N°.45 da ANP de 25/08/2014, publicada no DOU em 26/08/2014 pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Essa norma regulamenta os parâmetros mínimos de qualidade do biodiesel nacional, de forma a garantir que o consumidor receba um combustível eficaz, com características que contribuam ao bom funcionamento, desempenho e integridade do motor.

As propriedades do biodiesel produzido a partir do óleo da microalga *M. decolor* foram determinadas para verificar sua possível inserção na matriz energética nacional. Tais propriedades foram estimadas a partir do perfil graxo dos lipídeos da biomassa *in natura* de *M. decolor* e de seus diferentes extratos, tanto de extrações convencionais (TABELA 13) quanto das realizadas com fluidos pressurizados (TABELA 14).

O teor de insaturação do biodiesel (ADU, do inglês *Average Degree of Unsaturation*) é extremamente importante no cálculo empírico das propriedades combustíveis, pois através desse é possível projetar valores para o poder calorífico (°C), viscosidade cinemática (mm²/s) e densidade (g/cm³), entre outros. O maior valor de ADU das extrações convencionais foi encontrado para o óleo extraído em Soxhlet com a mistura hexano:etanol (1,41±0,0). Já para as extrações realizadas com fluidos pressurizados, o maior ADU foi observado nas extrações realizadas com sc-CO₂ (1,6±0,0). Embora não exista uma norma específica que regule este padrão de qualidade, sabe-se que quanto mais insaturado for o combustível, menor a sua tendência à cristalização e maior a sua estabilidade à oxidação.

TABELA 13 – VALORES PREDITIVOS DAS PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS DO BIODIESEL DA MICROALGA DULCÍCOLA *M. decolor*, PROVENIENTE DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS.

Propriedade	FAME obtidos a partir de diferentes solventes				
	Etanol	Hexano	Clorofórmio: metanol (2:1)	Hexano: etanol (2:1)	Bligh; Dyer (1959)
ADU	1,31±0,0	1,39±0,0	1,39±0,0	1,41±0,0	1,39±0,0
VC (mm ² /s)	4,38±0,0	4,33±0,0	4,33±0,0	4,32±0,0	4,33±0,0
Densidade (g/cm ³)	0,88±0,0	0,88±0,0	0,88±0,0	0,88±0,0	0,88±0,0
CN	54,16±0,0	53,62±0,1	53,62±0,0	53,49±0,0	53,64±0,1
II (g/100 g)	109,91±0,3	115,98±1,9	115,99±0,6	117,39±0,9	115,77±1,5
PC (MJ/kg)	40,83±0,0	40,98±0,0	40,98±0,0	41,01±0,0	40,97±0,0
CFPP (°C)	22,89±4,5	21,25±0,8	18,84±2,5	23,78±6,5	15,95±5,1

FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: ADU: Teor de Insaturação do Biodiesel; VC: Viscosidade cinemática; NC: Número de Cetano; II: Índice de Iodo; PC: Poder Calorífico; CFPP: Ponto de Entupimento de Filtro a Frio.

TABELA 14 – VALORES PREDITIVOS DAS PROPRIEDADES COMBUSTÍVEIS DO BIODIESEL DA MICROALGA DULCÍCOLA *M. decolor*, PROVENIENTE DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS EXTRAÇÕES COM FLUIDOS PRESSURIZADOS.

Propriedade	FAME obtidos a partir de diferentes solventes	
	Propano subcrítico	CO ₂ supercrítico
ADU	1,56±0,0	1,6±0,0
VC (mm ² /s)	4,22±0,0	4,2±0,0
Densidade (g/cm ³)	0,88±0,0	0,88±0,0
CN	52,5±0,1	52,22±0,0
II (g/100 g)	128,47±1,2	131,52±0,8
PC (MJ/kg)	41,27±0,0	41,35±0,0
CFPP (°C)	28,17±2,0	10,9±2,1

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: ADU: Teor de Insaturação do Biodiesel; VC: Viscosidade cinemática; NC: Número de Cetano; II: Índice de Iodo; PC: Poder Calorífico; CFPP: Ponto de Entupimento de Filtro a Frio.

As viscosidades cinemáticas estimadas para todos os extratos obtidos ficaram dentro das especificações definidas pelas normas brasileira (ANP 45/14, de 3 a 6 mm²/s), europeia (EN 14214, de 3,5 a 5 mm²/s) e norte americana (ASTM D6751, de 1,9 a 6 mm²/s). Este parâmetro é muito importante por influenciar diretamente os sistemas de injeção e de bombeamento de combustível do motor. Por exemplo,

quanto maior a viscosidade, menor a taxa de atomização do combustível na câmara de combustão (HOEKMAN *et al.*, 2012). Nos estudos realizados por Xu *et al.* (2006), foi encontrada uma viscosidade cinemática de 5,2 mm²/s para o biodiesel produzido a partir do óleo da clorofícea *C. protothecoides*.

Segundo a norma europeia DS (2008), os valores de densidade do óleo devem estar entre 0,85 e 0,90 Kg/L e essa faixa contempla todos os extratos investigados neste trabalho. A pouca variação nos valores de densidade obtidos para os diferentes extratos se deve à semelhança entre os seus perfis graxos, que mantém relativamente constante a relação entre o número de insaturações e o comprimento das cadeias carbônicas. A alteração na densidade do combustível afeta o volume de injeção do combustível e, portanto, o desempenho ou a performance do motor (KNOTHE, 2008; HOEKMAN *et al.*, 2012)

Xu *et al.* (2006) demonstraram que o biodiesel produzido a partir da clorofícea *Chlorella protothecoides* apresentou uma densidade de 0,864 g/cm³, que está dentro das normas internacionais para esse parâmetro. Da Cruz Lima *et al.* (2018), analisando o óleo produzido a partir da clorofícea *C. minor var. minor*, constataram que a sua densidade média (0,756 ± 0,3 g/cm³) estava ligeiramente fora da estabelecida pela norma europeia (EN 14214) de qualidade para o biodiesel.

O número de cetano (CN, do inglês *cetane number*) está diretamente relacionado ao tempo de retardamento da ignição e à qualidade da combustão, que são influenciadas positivamente pela presença de ácidos graxos de cadeia longa (RAMOS *et al.*, 2009). A norma brasileira (ANP 45/14) não estabelece nenhum valor de referência para o CN de amostras de biodiesel, principalmente por considerar que qualquer biodiesel de qualidade apresentará valores superiores aos normalmente observados para o diesel de petróleo. No entanto, sabe-se a maior parte do

biodiesel produzido no país é derivado da soja e que esse apresenta um CN igual a 49 (RAMOS *et al.*, 2009). Verificando os dados relativos ao número de cetano nas amostras oriundas das extrações convencionais (TABELA 13) e das realizadas com fluídos pressurizados (TABELA 14), constatou-se que o biodiesel derivado da microalga *M. decolor* apresentará valores acima dos recomendados pelas normas europeia (EN 14214, que é de 51) e americana (ASTM D6751, que é de 47), bem como superiores aos normalmente atribuídos ao biodiesel de óleo de soja. Os maiores valores de CN foram encontrados para a fração lipídica obtida a partir das extrações convencionais utilizando o etanol ($54,16 \pm 0,0$).

Calixto *et al.* (2018) observaram que o NC é inversamente proporcional ao ADU encontrado em amostras de biodiesel. Todas as clorofíceas estudadas apresentaram valores de NC acima de 50, assim como os valores relatados nas TABELA 13 e TABELA 14 para a *M. decolor* e seus diferentes extratos lipídicos.

O índice de iodo (II) está diretamente ligado ao grau de insaturação dos ácidos graxos presentes na amostra, sendo expresso em gramas de I_2 que reagem com 100 g da amostra (RAMOS *et al.*, 2009). No Brasil a ANP não estabelece valores limites para o índice de iodo, mas a norma europeia EN 14214 propõe um valor máximo de 120 g I_2 /100 g. O índice de iodo calculado dos materiais derivados de extrações convencionais da biomassa de *M. decolor* variou de $109,91 \pm 0,3$ a $117,39 \pm 0,9$ I_2 /100 g, demonstrando alguma diferença de seletividade entre os diferentes solventes extratores. Todos esses valores se apresentaram aderentes ao valor estabelecido pela norma europeia, sendo que o extrato etanólico resultou no menor valor. Por outro lado, as extrações com fluídos pressurizados resultaram em II calculados superiores ao limite máximo estabelecido na norma DS (2008) e esses corresponderam a $128,47 \pm 1,2$ e $131,52 \pm 0,8$ I_2 /100 g para propano subcrítico e sc-

CO₂, respectivamente. Isso significa que a extração com fluidos pressurizados apresentou maior seletividade para ácidos graxos poli-insaturados, algo extremamente interessante para a indústria alimentícia, mas relativamente problemático para aplicações combustíveis devido a um efeito negativo que esses componentes exercem sobre a estabilidade oxidativa do biodiesel.

Assim como para o número de cetano, não existe um valor mínimo para o poder calorífico (PC) do biodiesel pela norma brasileira, mas esse valor é importante para antecipar o desempenho ou a quantidade de energia liberada pelo combustível em câmara de combustão de motores do ciclo diesel. Os valores calculados para o PC de todas as amostras derivadas da microalga *M. decolor*, independentemente do método de extração utilizado, ficaram entre $40,83 \pm 0,0$ e $41,35 \pm 0,0$ MJ/kg, próximo ao encontrado por Nascimento *et al.* (2014) para o diesel comercial, que foi cerca de 45,7 MJ/kg.

A exposição a baixas temperaturas no inverno pode causar a cristalização de componentes parafínicos presentes em combustíveis do ciclo diesel. O ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP, do inglês *Cold Filter Plugging Point*) corresponde à temperatura em que estes cristais atingem dimensões que dificultam a fluidez do combustível, interferindo diretamente no funcionamento do motor. Para cada região brasileira a ANP estabelece limites diferentes para o CFPP e isso se deve ao clima específico de cada região, particularmente durante o inverno (RAMOS *et al.*, 2017). A variação deste parâmetro se dá entre 8 a 14 C para os Estados de SP, MG e MS, de 10 a 14 C para GO/DF, MT, ES e RJ, e de 5 a 14 C para região sul do país. Os outros estados não contemplados nesta lista se enquadram na norma da ANP 45/14 (19 C).

Tomando por base esse parâmetro, observa-se na TABELA 13 que apenas os extratos obtidos em Soxhlet com a mistura de cloroformio:metanol (2:1) e pela metodologia de Bligh; Dyer (1959) adaptada por Borges *et al.* (2016) se enquadrariam nas recomendações da norma para as regiões Norte e Nordeste do Brasil, que é de 19 °C. Já para os extratos obtidos com fluídos pressurizados (TABELA 14), apenas os realizados com CO₂ estariam de acordo com a norma para as regiões centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) e sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) do país. A variação observada entre os valores de CFPP das diferentes amostras pode ser aplicada pelos seus respectivos teores de ésteres saturados, já que esses afetam diretamente as propriedades de fluxo a frio do combustível. A partir de seu ponto de fusão elevado, derivados de ácidos graxos saturados tendem a solidificar mais rápido em temperaturas mais baixas e isso se deve às ocorrência de fortes ligações intermoleculares entre as moléculas (DA SILVA *et al.*, 2006). Uma alternativa para a correção desse parâmetro seria a mistura de biodieseis de diferentes matrizes que possuam cadeias insaturadas (ácido oleico e/ou linoleico) ou aditivos anti-congelantes capazes de possibilitar o ajuste às normas, como aditivos polímeros, por exemplo (RAMOS *et al.*, 2017).

Nascimento *et al.* (2013) estimaram as propriedades combustíveis do biodiesel derivado do óleo de microalgas da classe Trebouxyophyceae empregando equações empíricas (TABELA 15). Os valores de NC e de II da microalga *Botryococcus braunii* são próximos aos encontrados para a *M. decolor*, que também pertence a mesma classe.

TABELA 15 – PROPRIEDADES ESTIMADAS DO BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEOS DE MICROALGAS DA CLASSE TREBOUXYOPHYCEAE.

Espécies	CN	II (g/100 g)	CFPP (°C)
<i>Chlorella vulgaris</i> (IBL-C105)	61,83	52,63	-10,81
<i>Botryococcus braunii</i> (IBL-C117)	52,67	94,6	-7,96
<i>Botryococcus terribilis</i> (IBL-C115)	59,5	66,9	-10,26

FONTE: Adaptado de Nascimento *et al.* (2013).

LEGENDA: CN - Número de Cetano; II - Índice de iodo; CFPP - Ponto de entupimento do filtro frio.

5.6 BIOMASSA RESIDUAL

Os processos de conversão de biomassa normalmente geram o acúmulo de resíduos muitas vezes não aproveitados da forma correta, seja por ineficiência na reutilização ou pela má destinação no descarte, deixando assim de contribuir à geração de lucro em processos que minimizem a geração de poluentes. A partir da aplicação do conceito de biorrefinaria, busca-se reverter esse quadro fazendo com que o aproveitamento de resíduos possa contribuir ao aumento e diversificação das fontes de lucro.

Pesquisas despontam cada vez mais à utilização da biomassa de microalgas em aplicações de bioenergia. No entanto, essa biomassa também oferece oportunidades interessantes que levariam ao aproveitamento integral da matriz, composta majoritariamente por lipídeos, carboidratos e proteínas. A partir desse conceito, análises foram realizadas na biomassa desengordurada de *M. decolor* visando avaliar o seu potencial para uso como ração animal e material de partida para outros processos de conversão (TABELA 16).

A TABELA 16 demonstra que a biomassa desengordurada ainda apresentou teores relativamente altos de material lipídico em sua composição. Isso se explica pela diversidade de lipídeos que compõem a biomassa de microalgas, cuja

compartimentalização e acessibilidade química no citoplasma e/ou parede celular pode ter impedido a sua extração integral.

TABELA 16 – COMPOSIÇÃO MAJORITÁRIA DA BIOMASSA DESENGORDURADA DE *M. decolor*.

Extração	Solvente	Composição (g/100 g)		
		Lipídeos ^a	Proteínas ^b	Carboidratos ^c
Soxhlet	Etanol	5,72 ± 0,70	26,42 ± 0,84	10,97 ± 1,36
	Hexano	8,81 ± 0,52	15,51 ± 1,49	16,01 ± 1,08
	Clorofórmio:metanol	6,40 ± 0,39	25,63 ± 1,30	13,18 ± 1,10
	Hexano:Etanol	7,02 ± 0,23	17,86 ± 1,54	12,60 ± 1,67
Bligh; Dyer (1959)	Clorofórmio:metanol	6,69 ± 0,23	18,98 ± 1,00	11,89 ± 1,82
Fluidos pressurizados	Propano subcrítico	8,40 ± 1,54	14,18 ± 2,04	10,43 ± 0,14
	sc-CO ₂	9,82 ± 0,32	16,65 ± 1,18	14,44 ± 1,80

Fonte: O autor (2019).

Legenda: As letras a, b e c representam a análise estatística de cada variável em relação aos metabolitos quantificados. Letras iguais não diferem significativamente entre si (one-way ANOVA, $p > 0,05$).

Os menores teores de lipídeos totais foram observados para a biomassa extraída com etanol (5,72 g/100 g). Já os maiores teores de lipídeos totais foram observados na biomassa extraída com CO₂ (9,82 g/100 g). Como esperado, os maiores teores de lipídeos totais foram encontrados nos materiais derivados das extrações que geraram os menores rendimentos de extrato bruto.

Os maiores teores de proteínas foram observados para as amostras extraídas em Soxhlet utilizando etanol como solvente extrator (26,42 g/100 g; TABELA 16), um aumento de 5,52% se comparado ao teor inicial de proteínas encontrado na biomassa *in natura*. O segundo maior teor de proteínas foi derivado das extrações realizadas com a mistura de clorofórmio:metanol (25,63 g/100 g), que representa um aumento de 4,73% em relação ao material de origem.

Diferentes classes de proteínas compõem as células microbianas, podendo apresentar-se de forma simples ou conjugada a outros componentes celulares. A

partir da natureza química de cada grupo prostético as proteínas conjugadas são classificadas em: lipoproteínas (lipídeos), glicoproteínas (carboidratos), fosfoproteínas (fosfato) e metaloproteínas (metais) (NELSON; COX, 2018). Vale ressaltar que a presença de alto teor de proteínas na massa deslipídada (ou extraída) de microalgas é determinante para que essa apresente potencial para uso como componente de rações animais.

As biomassas deslipídadas (TABELA 16) apresentaram diferentes teores de carboidratos, que podem ser encontrados em componentes da parede celular (celulose, quitina) ou em substância de reserva como o amido (NELSON; COX, 2018). O maior percentual foi encontrado no resíduo das extrações convencionais com hexano (16 g/100 g; TABELA 16), caracterizando um aumento de 3,58% em relação ao teor inicialmente encontrado na biomassa *in natura*. Já a menor concentração de carboidratos foi observada na biomassa extraída com etanol (10,97 g/100 g; TABELA 16), valor 1,45% inferior à biomassa *in natura*. Para o material residual das extrações com fluídos pressurizados, os maiores níveis de proteínas (16,65 g/100 g) e carboidratos (14,44 g/100 g) foram observados para a biomassa extraída com sc-CO₂. Estes resultados confirmam a seletividade dos diferentes solventes, para com os componentes celulares de interesse da microalga *M. decolor*.

As análises dos dados obtidos para a biomassa residual de *M. decolor* por meio de *one-way* ANOVA revelaram que não houve variações significativas entre os métodos de extração e nem entre os solventes utilizados ($p > 0,05$) para extração dos componentes celulares, mas sim entre os metabólitos quantificados ($p < 0,05$). O teste *a posteriori* demonstrou que todos os componentes (proteína, carboidrato e lipídeo) diferiram entre si ($p < 0,05$).

A literatura traz consigo uma gama de trabalhos baseados no aproveitamento da biomassa desengordurada de microalgas para produção de diversos produtos de interesse comercial. Por exemplo, os carboidratos contidos na biomassa desengordurada podem ser utilizados para a produção de etanol. Vários pesquisadores já estudaram esse processo a partir de várias espécies de microalgas e os resultados foram aparentemente satisfatórios. Harun *et al.* (2011) obtiveram um rendimento máximo de 26,1 gramas de etanol por grama de biomassa depois do pré-tratamento alcalino do resíduo desengordurado da microalga *Chlorococcum infusionum*. Lee *et al.* (2019b) otimizaram a produção de etanol através da hidrólise ácida da biomassa da microalga *Nannochloropsis gaditana*, atingindo uma produção máxima de 4,84 g/L para um rendimento de hidrólise de 0,37 g/g.

A aplicação da biomassa desengordurada de microalgas na formulação de ração animal também vem sendo postulada devido a sua composição majoritariamente proteica. Austic *et al.* (2013) concluíram em seus estudos que a inserção de 7,5% da biomassa desengordurada da diatomácea *Staurosira* sp. foi adequada para frangos de corte como substituinte a uma mistura proteica for farelos de milho e soja. Com isso, cerca de 2,4 milhões de toneladas de soja poderiam ser poupados e assim destinados a alimentação humana anualmente.

Kiron *et al.* (2016) observaram em seu trabalho que a aplicação de 20% de biomassa desengordura da microalga *Desmodesmus* sp. na dieta de salmão do Atlântico não causaram nenhum efeito negativo sobre o desenvolvimento e metabolismo dos peixes, substituindo a farinha de peixe utilizada na produção de rações. Gatrell *et al.* (2018) demonstraram que, além da biomassa desengordurada não prejudicar o desenvolvimento de frangos, sua presença desencadeou um melhor estímulo à síntese protéica nos músculos e no fígado dos animais estudados.

Na esteira de outras aplicações associadas à produção de bioenergia, Yang *et al.* (2011) utilizaram a biomassa desengordurada de *Scenedesmus* sp. como substrato para a obtenção de biocombustíveis e obtiveram rendimentos de $46,0 \pm 2,4$ mL de hidrogênio por grama de sólidos voláteis e $393,6 \pm 19,5$ mL de CH₄ por grama de sólidos voláteis em processos integrados de produção. Já Chernova; Kiseleva (2017), mediante o tratamento térmico das biomassas desengorduradas de *Arthrospira platensis* e *Chlorococcum* sp., produziram hidrogênio por fermentação anaeróbia, além de acetona e butanol em rendimentos apreciáveis.

O emprego de hidrolisados da biomassa desengordurada de microalgas como suplemento para o cultivo de outras espécies de microalgas também já foi descrito na literatura. Maurya *et al.* (2016) obtiveram uma melhoria significativa na produtividade de biomassa e no rendimento lipídios de *C. vulgaris* utilizando hidrolisados dessa natureza nos cultivos. Abomohra *et al.* (2018) também obtiveram resultados satisfatórios nessa mesma linha de investigação estudando cultivos da microalga *Scenedesmus obliquus*.

No mundo da nanotecnologia, a biomassa desengordurada de *Chlorella* sp. foi utilizada por Song *et al.* (2017) para a produção de ânodos Sn para baterias de íons de lítio. Os resultados obtidos demonstraram-se eficientes e abriram o caminho para o uso deste material nesse tipo de aplicação.

6 CONCLUSÃO

A biomassa da microalga *M. decolor* pode ser definida como uma matriz de grande potencial para a produção de bioenergia e insumos para aplicação nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia. Sua composição centesimal apresenta altos teores de carboidratos, proteínas e lipídeos, além de pigmentos de alto valor agregado como a luteína.

O método de secagem da biomassa de *M. decolor* interferiu no processo de obtenção de seus componentes lipídicos. A secagem em estufa de circulação de ar a 35°C foi mais vantajosa do que a liofilização por ser mais barata e render um maior rendimento de extração dos metabólitos de interesse.

Entre os vários métodos de extração investigados, o emprego de propano subcrítico como solvente extrator foi o de melhor desempenho por propiciar altos rendimentos de recuperação de uma fração lipídica mais pura e adequada para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos com propriedades adequadas para uso como combustível em motores do ciclo diesel (biodiesel). Por fim, a biomassa desengordurada da microalga *M. decolor* apresentou bons teores de proteínas e carboidratos em sua composição, sendo uma biomassa com potencial para aplicação no desenvolvimento de rações animais, biocombustíveis e insumos para diferentes setores da indústria.

REFERÊNCIAS

- ABINANDAN, S.; SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; COLE, N.; DHARMARAJAN, R.; VENKATESWARLU, K.; MEGHARAJ, M. Sustainable production of biomass and biodiesel by acclimation of non-acidophilic microalgae to acidic conditions. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 316–324, 2019.
- ABOMOHR, A. E. F.; ELADEL, H.; EL-ESAWI, M.; WANG, S.; WANG, Q.; HE, Z.; FENG, Y.; SHANG, H.; HANELT, D. Effect of lipid-free microalgal biomass and waste glycerol on growth and lipid production of *Scenedesmus obliquus*: Innovative waste recycling for extraordinary lipid production. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 992–999, 2018.
- ADAMCZYK, M.; SAJDAK, M. Pyrolysis Behaviours of Microalgae *Nannochloropsis gaditana*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 11, p. 2221–2235, 2018.
- AL-AMERI, M.; AL-ZUHAIR, S. Using switchable solvents for enhanced, simultaneous microalgae oil extraction-reaction for biodiesel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 217–224, 2019.
- ALVES, J. L. F.; DA SILVA, J. C. G.; COSTA, R. L.; JUNIOR, S. F. D. S.; DA SILVA FILHO, V. F.; MOREIRA, R.D. F. P. M.; JOSÉ, H. J. Investigation of the bioenergy potential of microalgae *Scenedesmus acuminatus* by physicochemical characterization and kinetic analysis of pyrolysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 135, n. 6, p. 3269–3280, 2019.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier, 2005.
- ANDO, H.; RYU, A.; HASHIMOTO, A.; OKA, M.; ICHIHASHI, M. Linoleic acid and α -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. **Archives of Dermatological Research**, v. 290, n. 7, p. 375–381, 1998.
- ANDRADE, L. A.; BARROZO, M. A. S.; VIEIRA, L. G. M. Catalytic solar pyrolysis of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Solar Energy**, v. 173, p. 928–938, 2018.
- ANP 45/14. RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014. Disponível em: <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2014/agosto&item=ranp-45-2014>. Acesso em: 15 mar 2018.

- ANSARI, F. A.; GUPTA, S. K.; NASR, M.; RAWAT, I.; BUX, F. Evaluation of various cell drying and disruption techniques for sustainable metabolite extractions from microalgae grown in wastewater: A multivariate approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 634–643, 2018.
- ARABI, A. H.; DEEBAJAH, M.; BAZZI, M.; FAKHOURI, S.; CARTER, M. F.; WALTON, E.; ALANEE, S.; DABAJA, A. The effect of ethnicity on semen parameters in men who present with infertility. **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 4, p. e163, 2018.
- ARORA, N.; PATEL, A.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, V. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, 2016.
- ASHOKKUMAR, V.; SALAM, Z.; TIWARI, O. N.; CHINNASAMY, S.; MOHAMMED, S.; ANI, F.N. An integrated approach for biodiesel and bioethanol production from *Scenedesmus bijugatus* cultivated in a vertical tubular photobioreactor. **Energy Conversion and Management**, v. 101, p. 778–786, 2015.
- AUSTIC, R. E.; MUSTAFA, A.; JUNG, B.; GATRELL, S.; LEI, X. G. Potential and limitation of a new defatted diatom microalgal biomass in replacing soybean meal and corn in diets for broiler chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 7341–7348, 2013.
- AYODELE, B. V.; ALSAFFAR, M. A.; MUSTAPA, S. I. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, v. 245, p.118857. 2020.
- AZIZ, M. Integrated hydrogen production and power generation from microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 1, p. 104–112, 2016.
- AZIZ, M.; ZAINI, I. N. Energy-efficient Conversion of Microalgae to Hydrogen and Power. **Energy Procedia**, v. 105, p. 453–458, 2017.
- BACH, Q. V.; CHEN, W. H.; SHEEN, H. K.; CHANG, J. S. Gasification kinetics of raw and wet-torrefied microalgae *Chlorella vulgaris* ESP-31 in carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1393–1399, 2017.
- BAHADAR, A.; BILAL KHAN, M. Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, pp.128-148. 2013.
- BALASUBRAMANIAN, R. K.; YEN DOAN, T. T.; OBBARD, J. P. Factors affecting

cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 929–936, 2013.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 1479–1492, 2011.

BALLESTEROS, M.; PALOMA, M. Liquid Biofuels. In: The Role of Bioenergy in the Bioeconomy, **Academic Press**, p. 113-144. 2019.

BASOVA, M. M. Fatty acid composition of lipids in microalgae. **International Journal on Algae**, v. 7, n. 1, p. 33–57, 2005.

BAUDELET, P. H.; RICOCHON, G.; LINDER, M.; MUNIGLIA, L. A new insight into cell walls of Chlorophyta. **Algal Research**, v. 25, p. 333-371, 2017.

BAUMGARDT, F. J.; ZANDONÁ FILHO, A.; BRANDALIZE, M.V.; DA COSTA, D.C.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; ABREU, P. C.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 89–95, 2016.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210. 2007.

BELOTTI, G.; DE CAPRARIIS, B.; DE FILIPPIS, P.; SCARSELLA, M.; VERDONE, N. Effect of *Chlorella vulgaris* growing conditions on bio-oil production via fast pyrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 187–195, 2014.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BORGES, L.; CALDAS, S.; D'OCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 164–168, 2016.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. Vol. 4. Springer Science & Business Media, 2013.

CALIXTO, C. D.; SANTANA, J. K. S.; DE LIRA, E. B.; SASSI, P. G. P.; ROSENHAIM,

R.; SASSI, C. F. C.; DA CONCEIÇÃO, M.M.; SASSI, R. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 438–446, 2016.

CALIXTO, C. D.; SANTANA, J. K. S.; TIBÚRCIO, V. P.; SASSI, C. F. C.; DA CONCEIÇÃO, M. M.; SASSI, R. Productivity and fuel quality parameters of lipids obtained from 12 species of microalgae from the northeastern region of Brazil. **Renewable Energy**, v. 115, p. 1144–1152, 2018.

CEDRÓN, J. C.; MONCADA, A.; MENDOZA, P. Análisis de biodiesel preparado a partir de residuos de aceite doméstico, mediante RMN. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 80, n. 1, p. 3-8, 2014.

CANCELA, A.; PÉREZ, L.; FEBRERO, A.; SÁNCHEZ, A.; SALGUEIRO, J. L.; ORTIZ, L. Exploitation of *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel and pellet production. **Renewable Energy**, v. 133, p. 725–730, 2019.

CASTRO, Y. A.; ELLIS, J. T.; MILLER, C. D.; SIMS, R. C. Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 140, p. 14–19, 2015.

CHAN, M. C.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHEN, C. Y.; HUANG, C. C.; CHANG, J. S. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 24–31, 2013.

CHATURVEDI, R.; FUJITA, Y. Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level. **Phycological Research**, v. 54, n. 3, p. 208–219, 2006.

CHEAH, W. Y.; SHOW, P. L.; CHANG, J. S.; LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, 2015.

CHEE LOONG, T.; IDRIS, A. Rapid alkali catalyzed transesterification of microalgae lipids to biodiesel using simultaneous cooling and microwave heating and its optimization. **Bioresource Technology**, v. 174, p. 311–315, 2014.

CHEE LOONG, T.; IDRIS, A. One step transesterification of biodiesel production

using simultaneous cooling and microwave heating. **Journal of Cleaner Production**, v. 146, p. 57–62, 2017.

CHEN, H.; WANG, Q. Microalgae-based nitrogen bioremediation. **Algal Research**, v. 46, p.101775, 2020.

CHEN, W.; MA, L.; ZHOU, P. P.; ZHU, Y. M.; WANG, X. P.; LUO, X. A.; BAO, Z. D.; YU, L. J. A novel feedstock for biodiesel production: The application of palmitic acid from *Schizochytrium*. **Energy**, v. 86, p. 128–138, 2015.

CHERNOVA, N. I.; KISELEVA, S. V. Microalgae biofuels: Induction of lipid synthesis for biodiesel production and biomass residues into hydrogen conversion. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 5, p. 2861–2867, 2017.

CHIA, S. R.; ONG, H.C.; CHEW, K. W.; SHOW, P. L.; PHANG, S. M.; LING, T. C.; NAGARAJAN, D.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 129, p. 838–852, 2018.

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; BUFFI, M.; TACCONI, D. Sustainable bio kerosene: Process routes and industrial demonstration activities in aviation biofuels. **Applied Energy**, v. 136, p. 767–774, 2014.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 4, p. 194-204, 1986.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHNG, L. M.; CHAN, D. J. C.; LEE, K. T. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. **Journal of Cleaner Production**, v. 130, p. 68–73, 2016.

CHOI, W. Y.; LEE, H. Y. Effective production of bioenergy from marine *Chlorella* sp. by high-pressure homogenization. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 1, p. 81–89, 2015.

CHUANBIN, L.; JIAN, X.; FENGWU, B.; ZHIGUO, S. Trehalose extraction from *Saccharomyces cerevisiae* after microwave treatment. **Biotechnology Techniques** v.12, n. 12, p.941-943, 1998.

CRAMPON, C.; MOUAHID, A.; TOUDJI, S.A.A.; LÉPINE, O.; BADENS, E. Influence

of pretreatment on supercritical CO₂ extraction from *Nannochloropsis oculata*. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 79, p. 337–344, 2013.

CRAMPON, C.; NIKITINE, C.; ZAIER, M.; LÉPINE, O.; TANZI, C. D.; VIAN, M. A.; CHEMAT, F.; BADENS, E. Oil extraction from enriched *Spirulina platensis* microalgae using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 289–296, 2017.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; SCHEER, A. P.; SANTA, O. R. D.; QUEIROGA, C.L.; CORAZZA, M.L. Kinetics, composition and biological activity of Eupatorium intermedium flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 145–153, 2015.

OLECH, M.; CZERWIK-MARCINKOWSKA, J.; MASSALSKI, A.; WOJCIECHOWSKA, A. Morphology, ultrastructure and ecology of *Muriella decolor* (Chlorophyta) from subaerial habitats in Poland and the Antarctic. **Polish Polar Research**, v. 36, n. 2, p. 163–174, 2015.

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832-841, 2016.

D'ALESSANDRO, E. B.; SOARES, A. T., COSTA, D. C., NETO, H. D. A. S., FERNANDES, V. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R. A thermal water microalga: *Eutetramorus planctonicus* as a promising source of fatty acids and lutein. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 5, p. 6707–6713, 2018.

D'ALESSANDRO, E. B.; SOARES, A. T., LOPES, R. G., DERNER, R. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Lutein and biodiesel sequential production from microalga using an environmentally friendly approach. **Chemical Engineering Communications**, p. 1-11, 2020.

DA CRUZ LIMA, A. A.; SZCZERBOWSKI, D.; ZANDONÁ FILHO, A.; DERNER, R. B.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. *Choricystis minor* var. *minor* lipids: Extraction using conventional and pressurized solvents and assessment of their potential to produce fatty acid methyl esters. **Algal Research**, v. 33, p. 28–35, 2018.

DA SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. **Brazilian Journal of Pharmaceutical**

Sciences, v. 42, n. 2, p. 223–235, 2006.

D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; LEMOES, J. S.; MIYASAKI, E. K.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; PRIMEL, E. G.; ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533–1538, 2011.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1159-1179, 2016.

DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, M. A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 51–59, 2000.

DEL RÍO, E.; ARMENDÁRIZ, A.; GARCÍA-GÓMEZ, E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 103–107, 2015.

DEVI, A. C.; TAVANANDI, H. A.; GOVINDARAJU, K.; RAGHAVARAO, K. S. M .S. An effective method for extraction of high purity phycocyanins (C-PC and A-PC) from dry biomass of *Arthrospira maxima*. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–11, 2020.

DO, B. C.; THI-THU, D.; BERRIN, J. G.; HALTRICH, D.; KIM-ANH, T.; SIGOILLOT, J. C.; YAMABHAI, M. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 3, p. 59, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356. 1956.

EN 14214. **Committee for Standardization Automotive fuels—fatty acid FAME (FAME) for diesel engines—requirements and test methods**. European Committee for Standardization, Brussels; 2003a. Method EN 14214.

EL-DALATONY, M. M.; SALAMA, E. S.; KURADE, M. B.; KIM, K. Y.; GOVINDWAR, S. P.; KIM, J. R.; KWON, E. E.; MIN, B.; JANG, M.; OH, S. E.; CHANG, S. W. Whole conversion of microalgal biomass into biofuels through successive high-throughput

fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 360, p. 797–805, 2019.

ESCORSIM, A. M.; ROCHA, G.; VARGAS, J. V.; MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; CORAZZA, M. L.; CORDEIRO, C. S. Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, p. 470–478, 2018.

ETTL, H.; GÄRTNER, G. **Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen**. p.13-638, Springer-Verlag, 2013.

FANG, Y. R.; YEH, Y.; LIU, H. S. A novel strategy of biodiesel production from wet microalgae by direct saponification–esterification conversion (DSEC). **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 83, p. 23–31, 2018.

FENG, D.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; SUN, S. Catalytic effects of ion-exchangeable K^+ and Ca^{2+} on rice husk pyrolysis behavior and its gas–liquid–solid product properties. **Energy**, v. 152, p. 166–177, 2018.

FERMOSO, J.; PIZARRO, P., CORONADO, J. M.; SERRANO, D. P. Advanced biofuels production by upgrading of pyrolysis bio-oil. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment**, v. 6, n. 4, p. e245, 2017.

FIGUEIRA, C. E.; MOREIRA, P. F.; GIUDICI, R. Thermogravimetric analysis of the gasification of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 717–724, 2015.

FISCHER, C. R.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; STEPHANOPOULOS, G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 295–304, 2008.

FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global bioenergy potentials through 2050. **Biomass and Bioenergy**, v. 20, n. 3, p. 151–159, 2001.

FLECHTNER, V. R.; JOHANSEN, J. R.; CLARK, W. H. Algal composition of microbiotic crusts from the central deserts of Baja California, Mexico. **The Great Basin Naturalist**, v. 58, n. 4, p. 295–311, 1998.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1956.

FRIEDL, T.; RYBALKA, N. **Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status**. In *Progress in Botany*, v. 73, p.259–280, 2012.

GAO, K.; ORR, V.; REHMANN, L. Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 77–85, 2016.

GATRELL, S. K.; MAGNUSON, A. D.; BARCUS, M.; LEI, X. G. Graded levels of a defatted green microalgae inclusion in diets for broiler chicks led to moderate up-regulation of protein synthesis pathway in the muscle and liver. **Algal Research**, v. 29, p. 290–296, 2018.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493–507, 2009.

GRUBER-BRUNHUMER, M. R.; SCHÖBERL, A.; ZOHAR, E.; KOENIGSBERGER, S.; BOCHMANN, G.; UHER, B.; LANG, I.; SCHAGERL, M.; FUCHS, W.; DROSG, B. Cultivation of the microalga *Eustigmatos magnus* in different photobioreactor geometries and subsequent anaerobic digestion of pre-treated biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 128, p. 105303, 2019.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M. H. M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243-260, 2015.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712-725, 2015.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732 2012.

HAN, W.; XU, X.; GAO, Y.; HE, H.; CHEN, L.; TIAN, X.; HOU, P. Utilization of waste cake for fermentative ethanol production. **Science of the Total Environment**, v. 673, p. 378–383, 2019.

HARADA, H.; YAMASHITA, U.; KURIHARA, H.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KAMEI, Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance

in a marine red alga. **Anticancer Research**, v. 22, n. 5, p. 2587–2590, 2002.

HARIPRASATH, P.; SELVAMANI, S. T.; VIGNESHWAR, M.; PALANIKUMAR, K.; JAYAPERUMAL, D. Comparative analysis of cashew and canola oil biodiesel with homogeneous catalyst by transesterification method. **Materials Today: Proceedings**, v. 16, p.1357–1362, 2019.

HARUN, R.; JASON, W. S. Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M. K. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3464–3467, 2011.

HASAN, M. F.; VOGT, F. Quantitative modeling of microalgae based sequestration of atmospheric CO₂. **Analyst**, v. 143, n. 5, p. 1042–1045, 2018.

HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.

HOEKMAN, S. K.; BROCH, A.; ROBBINS, C.; CENICEROS, E.; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 143-169, 2012.

HONG, Y.; CHEN, W.; LUO, X.; PANG, C.; LESTER, E.; WU, T. Microwave-enhanced pyrolysis of macroalgae and microalgae for syngas production. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 47–56, 2017.

HONG, Z.; ZHONG, F.; NIU, W.; ZHANG, K.; SU, J.; LIU, J.; LI, L.; WU, F. Effects of temperature and particle size on the compositions, energy conversions and structural characteristics of pyrolysis products from different crop residues. **Energy**, v. 190, p. 116413, 2020.

HOWLADER, M. S.; DUBIEN, J.; RAI, N.; FRENCH, W.T. Optimization of microbial cell disruption using pressurized CO₂ for improving lipid recovery from wet biomass. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.42, n. 5, p. 763-776. 2019.

HOYER, J.; COTTA, F.; DIETE, A.; GROßMANN, J. Bioenergy from Microalgae - Vision or Reality? **ChemBioEng Reviews**, v. 5, n. 4, p. 207–216, 2018.

HU, Z.; ZHENG, Y.; YAN, F.; XIAO, B.; LIU, S. Bio-oil production through pyrolysis of blue-green algae blooms (BGAB): Product distribution and bio-oil characterization. **Energy**, v. 52, p. 119–125, 2013.

JOHANSEN, J. R.; LOWE, R. L.; CARTY, S.; FUČIKOVÁ, K.; OLSEN, C. E.; FITZPATRICK, M. H.; RESS, J. A.; FUREY, P. C. New Algal Species Records for Great Smoky Mountains National Park, with an Annotated Checklist of all Reported Algal Taxa for The Park. **Southeastern Naturalist**, v. 6, p. 99–134, 2007.

JULIARNITA, I. G. A.; HADISOEBROTO, R.; RINANTI, A. **Bioethanol production from mixed culture microalgae biomass with temperature hydrolysis variation**. In: MATEC Web of Conferences. v. 197, p.13010, 2018.

KARACOR, K.; CAM, M. Effects of oleic acid. **Medical Science and Discovery**, v. 2, n. 1, p. 125, 2015.

KIM, D. Y.; VIJAYAN, D.; PRAVEENKUMAR, R.; HAN, J. I.; LEE, K.; PARK, J. Y.; CHANG, W. S.; LEE, J. S.; OH, Y. K. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 300-310, 2016.

KIRON, V.; SØRENSEN, M.; HUNTLEY, M.; VASANTH, G. K.; GONG, Y.; DAHLE, D.; PALIHAWADANA, A. M. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, p. 67, 2016.

KNOTHE, G. “Designer” biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy and Fuels**, v. 22, n. 2, p. 1358–1364, 2008.

KRISNANGKURA, K. A simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 63, n. 4, p. 552–553, 1986.

KWAN, T. A.; KWAN, S. E.; PECCIA, J.; ZIMMERMAN, J. B. Selectively biorefining astaxanthin and triacylglycerol co-products from microalgae with supercritical carbon dioxide extraction. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 81–88, 2018.

LECINA, M.; SANCHEZ, B.; SOLÀ, C.; PRAT, J.; ROLDÁN, M.; HERNÁNDEZ, M.; BRAGÓS, R.; PAREDES, C.J.; CAIRÓ, J.J. Structural changes of *Arthrospira* sp. after low energy sonication treatment for microalgae harvesting: Elucidating key parameters to detect the rupture of gas vesicles. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 98–104, 2017.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89-101, 2012.

LEE, O. K.; KIM, A. L.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; JUNG, Y. T.; LEE, J. W.; LEE, E. Y. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 197–201, 2013.

LEE, B.; CHOI, G. G.; CHOI, Y. E.; SUNG, M.; PARK, M. S.; YANG, J. W. Enhancement of lipid productivity by ethyl methane sulfonate-mediated random mutagenesis and proteomic analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 6, p. 1036–1042, 2014.

LEE, J. H.; LEE, H. U.; LEE, J.H.; LEE, S. K.; YOO, H. Y.; PARK, C.; KIM, S. W. Continuous production of bioethanol using microalgal sugars extracted from *Nannochloropsis gaditana*. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 71–76, 2019.

LEI, X. G. Sustaining the Future of Animal Feed Protein. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 74–76, 2018.

LEONG, Y. K.; CHANG, J. S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122886, 2020.

LETAWE, C.; BOONE, M.; PIÉRARD, G. E. Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 56–58, 1998.

LI, Y.; HAN, D.; HU, G.; DAUVILLEE, D.; SOMMERFELD, M.; BALL, S.; HU, Q. *Chlamydomonas starchless* mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. **Metabolic Engineering**, v. 12, n. 4, p. 387–391, 2010a.

LI, Y.; HAN, D.; HU, G.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 258–268, 2010b.

LIMA, G. M.; TEIXEIRA, P.C.; TEIXEIRA, C.M.; FILÓCOMO, D.; LAGE, C.L. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, p. 157–166, 2018.

LIN, J. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Lutein production from biomass: Marigold

flowers versus microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 421–428, 2015.

LIN, X.; PASKALEVA, E. E.; CHANG, W.; SHEKHTMAN, A.; CANKI, M. Inhibition of HIV-1 infection in ex vivo cervical tissue model of human vagina by palmitic acid; implications for a microbicide development. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. e24803, 2011.

LIU, C.; JIAN, X.; FENGWU, B.; ZHIGUO, S. Trehalose extraction from *Saccharomyces cerevisiae* after microwave treatment. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 12, p. 941–943, 1998.

LIU, G.; LIAO, Y.; WU, Y.; MA, X. Synthesis gas production from microalgae gasification in the presence of Fe_2O_3 oxygen carrier and CaO additive. **Applied Energy**, v. 212, p. 955–965, 2018a.

LIU, G.; LIAO, Y.; WU, Y.; MA, X. Application of calcium ferrites as oxygen carriers for microalgae chemical looping gasification. **Energy Conversion and Management**, v. 160, p. 262–272, 2018b.

LIU, G.; LIAO, Y.; WU, Y.; MA, X. Reactivity of Co-doped $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ brownmillerite oxides as oxygen carriers for microalgae chemical looping gasification. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 5, p. 2546–2559, 2019.

LIU, Y.; LI, Y.; GAN, R.; JIA, H.; YONG, X.; YONG, Y.C.; WU, X.; WEI, P.; ZHOU, J. Enhanced biogas production from swine manure anaerobic digestion via in-situ formed graphene in electromethanogenesis system. **Chemical Engineering Journal**, v. 389, p. 124510, 2020.

LOWRY, O. H.; RANDALL, R. J. Protein Measurement by the Folin Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LOZANO-GARCIA, D. F.; CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; DEL RIO-HINOJOSA, E.; BETANCOURT, F.; ALEMAN-NAVA, G. S.; PARRA-SALDIVAR, R. Potential land microalgae cultivation in Mexico: From food production to biofuels. **Algal Research**, v. 39, p. 101459, 2019.

MA, N. L.; TEH, K. Y.; AHMAD, A.; LAM, S. S.; SAIDON, S. A. B.; HUSRI, M. N.; SAN, C. T. Metabolite profiling of *Scenedesmus regularis* using nuclear magnetic resonance (NMR). **Malaysian Applied Biology**, v. 48, n. 1, p. 117–121, 2019.

MA, C.; GENG, J.; ZHANG, D.; NING, X. Non-catalytic and catalytic pyrolysis of *Ulva prolifera* macroalgae for production of quality bio-oil. **Journal of the Energy**

Institute, v. 93, n. 1, p. 303–311, 2020.

MACDONALD, J. Coal and gas to stay cheap, but renewables still win race on costs. *Bloomberg New Energy Finance*, p. 12–15, 2016.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATTJE, L. G. B.; TORMEN, L.; BOMBARDELLI, M. C. M.; CORAZZA, M. L.; BAINY, E. M. Ginger essential oil and supercritical extract as natural antioxidants in tilapia fish burger. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 5, p. e13942, 2019.

MAURYA, R.; PALIWAL, C.; CHOKSHI, K.; PANCHHA, I.; GHOSH, T.; SATPATI, G.G.; PAL, R.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Hydrolysate of lipid extracted microalgal biomass residue: An algal growth promoter and enhancer. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 197–204, 2016.

MCGINN, P. J.; DICKINSON, K. E.; PARK, K. C.; WHITNEY, C. G.; MACQUARRIE, S. P.; BLACK, F. J.; FRIGON, J. C.; GUIOT, S. R.; O'LEARY, S.J. Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 155–165, 2012.

MEHTANI, J.; ARORA, N.; PATEL, A.; JAIN, P.; PRUTHI, P. A.; POLURI, K. M.; PRUTHI, V. Augmented lipid accumulation in ethyl methyl sulphonate mutants of oleaginous microalga for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 121–127, 2017.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1145–1150, 2007.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10–15, 2013.

MESOMO, M. C. **Obtenção de extrato de gengibre usando CO₂ supercrítico e**

propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica. 2013. 77 p, Tese – Doutorado em Engenharia de Alimentos. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. 2014.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 85–93, 2004.

MISHRA, S. K.; SUH, W.I.; FAROOQ, W.; MOON, M.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M.S.; YANG, J.W. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 330–333, 2014.

MOAZAMI, N.; ASHORI, A.; RANJBAR, R.; TANGESTANI, M.; EGHTESADI, R.; NEJAD, A.S. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 449–453, 2012.

MÖLLERS, K.; CANNELLA, D.; JØRGENSEN, H.; FRIGAARD, N. U. Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 64, 2014.

MONTALVO, G. E. B.; THOMAZ-SOCCOL, V.; VANDENBERGHE, L. P.; CARVALHO, J. C.; FAULDS, C. B.; BERTRAND, E.; PRADO, M. R.; BONATTO, S. J.; SOCCOL, C. R. *Arthrospira maxima* OF15 biomass cultivation at laboratory and pilot scale from sugarcane vinasse for potential biological new peptides production. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 103–113, 2019.

MORIOKA, L. R. I.; MATOS, Â. P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E. S. Floclulação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44–49, 2014.

MUJUMDAR, A. S.; MENON, A. S. Drying of solids: principles, classification, and selection of dryers. (A. S. Mujumdar, Org.) **Handbook of Industrial Drying**, v. 1, p. 1–39, 1995.

NASCIMENTO, D. R.; NETO, O. S.; DA CONCEIAO, L. R. V.; DA COSTA, C. E. F.; DA ROCHA FILHO, G. N.; ZAMIAN, J.R. Determination of carbon microresidue at mixtures of diesel/biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, p. 911–923, 2014.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.;

DRUZIAN, J. I.; DE SOUZA, C. O.; VICH, D. V.; DE CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013.

NARENDRAKUMAR, G.; THYAGARAJAN, R.; MELCHIAS, G. A. Comparative analysis of biodiesel production and its properties from *Leptolyngbya* sp. BI-107 and *Chlorella vulgaris* under heat shock stress. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p.502-506. 2018.

NEGREL, C.; CORNILLE, A.; DE ANDRADE NASCIMENTO, P.; ROBIN, J. J.; CAILLOL, S. New bio-based epoxy materials and foams from microalgal oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 4, p. 1600214, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NEVES, F. F.; HOINASKI, L.; RÖRIG, L. R.; DERNER, R. B.; LISBOA, H. M. Carbon biofixation and lipid composition of an acidophilic microalga cultivated on treated wastewater supplied with different CO₂ levels. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 40, n. 25, p. 3308–3317, 2019.

NING, J.; ZHOU, M.; PAN, X.; LI, C.; LV, N.; WANG, T.; CAI, G.; WANG, R.; LI, J.; ZHU, G. Simultaneous biogas and biogas slurry production from co-digestion of pig manure and corn straw: Performance optimization and microbial community shift. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 37–47, 2019.

NÚÑEZ-REGUEIRO, M. M.; FLETCHER, R. J.; SIDDIQUI, S. F. Effects of bioenergy on biodiversity arising from land-use change and crop type. **Conservation Biology**, p. 1-11, 2019.

BECERRA, M. O.; CONTRERAS, L. M.; LO, M. H.; DÍAZ, J. M.; HERRERA, G. C. Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 103771, 2020.

OLIVEIRA, S. S.; FERRAZ, C. Technological prospection of bio-oil production from biologia of *Chorella vulgaris* by the pyrolysis process. **Revista Gestão Inovação e Tecnologias**, v. 8, n. 4, p. 4660–4669, 2018.

ONAY, M.; SONMEZ, C.; OKTEM, H.A.; YUCEL, M. Evaluation of Various Extraction Techniques for Efficient Lipid Recovery from Thermo-Resistant Microalgae, *Hindakia*, *Scenedesmus* and *Micractinium* Species—Comparison of Lipid Extraction Methods from Microalgae. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 07, n. 02, p. 141–150, 2016.

ONAY, M. Investigation of Biobutanol Efficiency of *Chlorella* sp. Cultivated in Municipal Wastewater. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 06, n. 10, p. 40–50, 2018a.

ONAY, M. Bioethanol production from *Nannochloropsis gaditana* in municipal wastewater. **Energy Procedia**, v. 153, p. 253–257, 2018b.

ONAY, M. Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetrachotoma* ME03 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. **Fuel**, v. 239, p. 1315–1323, 2019.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. J. B. T. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 373–378, 2005.

ORTIZ-MARTÍNEZ V. M.; ANDREO-MARTINEZ, P.; GARCIA-MARTINEZ, N.; DE LOS RÍOS, A. P.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; QUESADA-MEDINA, J. Approach to biodiesel production from microalgae under supercritical conditions by the PRISMA method. **Fuel Processing Technology**, v.191, p. 211–222. 2019.

PAN, P.; HU, C.; YANG, W.; LI, Y.; DONG, L.; ZHU, L.; TONG, D.; QING, R.; FAN, Y. The direct pyrolysis and catalytic pyrolysis of *Nannochloropsis* sp. residue for renewable bio-oils. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4593–4599, 2010.

PASSOS, F.; SOLÉ, M.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. **Applied Energy**, v. 108, p. 168–175, 2013.

PATOVA, E.; DAVYDOV, D. A.; ANDREEVA, V. **Cyanoprokaryotes and algae**. In: Plants and fungiof the polar deserts in the northern hemisphere. p.133–166, 2015.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R. S.; KONWAR, B. K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307–3312, 2011.

- QI, F.; PEI, H.; HU, W.; MU, R.; ZHANG, S. Characterization of a microalgal mutant for CO₂ biofixation and biofuel production. **Energy Conversion and Management**, v. 122, p. 344–349, 2016.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.
- RAHEEM, A.; SIVASANGAR, S.; AZLINA, W. W.; YAP, Y. T.; DANQUAH, M. K.; HARUN, R. Thermogravimetric study of *Chlorella vulgaris* for syngas production. **Algal Research**, v. 12, p. 52–59, 2015.
- RAHEEM, A.; PRINSEN, P.; VUPPALADADIYAM, A. K.; ZHAO, M.; LUQUE, R. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. **Journal of Cleaner Production**, v. 181, p. 42–59, 2018.
- RAJAK, U.; NASHINE, P.; VERMA, T. N. Assessment of diesel engine performance using spirulina microalgae biodiesel. **Energy**, v. 166, p. 1025–1036, 2019.
- RAMESH KUMAR, V.; THYAGARAJAN, R.; MELCHIAS, G. A comparative analysis of biodiesel production and its properties from *Leptolyngbya* sp. BI-107 and *Chlorella vulgaris* under heat shock stress. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 502–506, 2018.
- RAMOS, L. P.; DA SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Biodiesel production technologies. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385–405, 2011.
- RAMOS, L. P.; KOTHE, V.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. S. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 317–369, 2017.
- RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261–268, 2009.
- RAOUI, Z.; MOUSAVI GARGARI, S. L. Biodiesel production from microalgae oil by lipase from *Pseudomonas aeruginosa* displayed on yeast cell surface. **Biochemical Engineering Journal**, v. 140, p. 1–8, 2018.
- REYIMU, Z.; ÖZÇİMEN, D. Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis*

oculata and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, p. 40–46, 2017.

RIES, J. Biodiversity and ecosystems: Acid ocean cover up. **Nature Climate Change**, v. 1, n. 6, p. 294-295, 2011.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

RIZZA, L. S.; SMACHETTI, M. E. S.; DO NASCIMENTO, M.; SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 2017.

RODRIGUEZ, J. M. F.; DE SOUZA, A. R. C.; KRÜGER, R. L.; BOMBARDELLI, M. C. M.; MACHADO, C. S.; CORAZZA, M. L. Kinetics, composition and antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa*) root extracts obtained with supercritical CO₂ and co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 135, p. 25–33, 2018.

SALES-CAMPOS, H.; REIS DE SOUZA, P.; CREMA PEGHINI, B.; SANTANA DA SILVA, J.; RIBEIRO CARDOSO, C. An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201–210, 2013.

SAMIEE-ZAFARGHANDI, R.; HADI, A.; KARIMI-SABET, J. Graphene-supported metal nanoparticles as novel catalysts for syngas production using supercritical water gasification of microalgae. **Biomass and Bioenergy**, v. 121, p. 13–21, 2019.

SAMORÌ, C.; PEZZOLESI, L.; GALLETTI, P.; SEMERARO, M.; TAGLIAVINI, E. Extraction and milking of astaxanthin from: *Haematococcus pluvialis* cultures. **Green Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3621–3628, 2019.

SANTOS, L. K.; HATANAKA, R. R.; OLIVEIRA, J. E.; FLUMIGNAN, D. L. Production of biodiesel from crude palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using subcritical water. **Renewable Energy**, v. 130, p. 633–640, 2019.

SASSI, P. G. P.; CALIXTO, C. D.; TIBÚRCIO, V. P.; NONATO, N. N.; ABRAHÃO, R.; HÉGARET, H.; SASSI, C. F. C.; SASSI, R. Effectiveness of nutrient remotion and cell physiology of *Amphora* sp. cultured in shrimp farm effluents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 18, p. 17920–17926, 2018.

SASSI, K. K. B.; SILVA, J. A. D.; CALIXTO, C. D.; SASSI, R.; SASSI, C. F. C. Metabolites of interest for food technology produced by microalgae from the Northeast Brazil. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 50, n. 1, p. 54–65, 2019.

SCHNEIDER, W. D. H.; FONTANA, R. C.; BAUDEL, H. M.; DE SIQUEIRA, F. G.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; DE EUGENIO, L. I.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, Á. T.; DILLON, A. J. P. Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by on-site manufacturing fungal enzymes to enhance second-generation ethanol yield. **Applied Energy**, v. 262, p. 114493, 2020.

SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Edible Oil and Fat Products**. Ames, Iowa: Wiley-Interscience, 6 ed, v.2, p. 577-653, 2005.

SHIN, Y. S.; JEONG, J.; NGUYEN, T. H. T.; KIM, J. Y. H.; JIN, E.; SIM, S. J. Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 368–374, 2019.

SHOMAL, R.; HISHAM, H.; MLHEM, A.; HASSAN, R.; AL-ZUHAIR, S. Simultaneous extraction–reaction process for biodiesel production from microalgae. **Energy Reports**, v. 5, p. 37–40, 2019.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; TAY, J. H.; LEE, T. M.; CHANG, J. S. Microalgal drying and cell disruption - Recent advances. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 258-266, 2015.

SHUKLA, S. P.; GITA, S.; BHARTI, V. S.; BHUVANESWARI, G. R.; WIKRAMASINGHE, W. A. A. D. L. Atmospheric carbon sequestration through microalgae: Status, prospects, and challenges. **Agro-Environmental Sustainability**, v. 1, p.219–235, 2017.

SILVA, V. L. O.; MELO, J. A.; OLIVEIRA, L. B.; PEDROSO, L. R.; SIMIONATTO, E. L.; DE MATOS, D. I.; SCHARF, D. R.; FIGUEIREDO, E. S.; WISNIEWSKI J. A. Esters from frying oil, sewage scum, and domestic fat trap residue for potential use as biodiesel. **Renewable Energy**, v. 135, p. 945–950, 2019.

SINGH, U. B.; AHLUWALIA, A. S. Microalgae: A promising tool for carbon sequestration. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 73-95, 2013.

SITEPU, E. K.; CORBIN, K.; LUO, X.; PYE, S. J.; TANG, Y.; LETERME, S. C.; HEIMANN, K.; RASTON, C. L.; ZHANG, W. Vortex fluidic mediated direct transesterification of wet microalgae biomass to biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 488–497, 2018.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel. **Fuel**, v. 217, p. 458–466, 2018.

SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SENDZIKIENE, E.; GUMBYTE, M. Microalgae *Chlorella* sp. cell disruption efficiency utilising ultrasonication and ultrahomogenisation methods. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2349–2354, 2019.

SONG, D.; PARK, J.; KIM, K.; LEE, L. S.; SEO, J. Y.; OH, Y. K.; KIM, Y. J.; RYOU, M. H.; LEE, Y. M.; LEE, K. Recycling oil-extracted microalgal biomass residues into nano/micro hierarchical Sn/C composite anode materials for lithium-ion batteries. **Electrochimica Acta**, v. 250, p. 59–67, 2017.

SOUOD, G.; MORSY, E.; HASSAN, L. Production of Bioethanol from microalga (*Chlorella vulgaris*). **THE EGYPTIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY (Botany)**, v. 13, n. 1, p. 1, 2017.

SOUZA, G. M.; BALLESTER, M. V. R.; CRUZ, C. H. B.; CHUM, H.; DALE, B.; DALE, V. H.; FERNANDES, E. C.; FOUST, T.; KARP, A.; LYND, L.; MACIEL FILHO, R. The role of bioenergy in a climate-changing world. **Environmental Development**, v. 23, p. 57-64, 2017.

SOUZA, V. H. A.; DOS SANTOS, L.T.; CAMPOS, A.F.; CAROLINO, J. Análise do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB): Resultados e Críticas. **Revista de Administração Geral**, v. 1, n. 1, p. 23–41, 2016.

SPECIFICATION FOR BIODIESEL (B100) – **ASTM D6751-07b Property ASTM Method Limits Units BOLD** = BQ-9000 Critical Specification Testing Once Production Process Under Control., March, 2007.

STEINER, B. M.; MCCLEMENTS, D. J.; DAVIDOV-PARDO, G. Encapsulation systems for lutein: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 82, p. 71-81, 2018.

STOCKER, T. F.; QIN, D.; PLATTNER, G. K.; TIGNOR, M.; ALLEN, S. K.; BOSCHUNG, J.; NAUELS, A.; XIA, Y.; BEX, V.; MIDGLEY, P. M.; ALEXANDER, L. V. **Climate change 2013 the physical science basis: Working Group I contribution to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change**. Cambridge Univ. Press, 2013.

STOKSTAD, E. Bioenergy not a climate cure-all, panel warns. **Science**, p. 527-528. 2019.

SU, Y.; SONG, K.; ZHANG, P.; SU, Y.; CHENG, J.; CHEN, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p. 402-411, 2017.

SUAREZ, P. A.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.667-676. 2007.

TALEBI, A. F.; MOHTASHAMI, S. K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; MIRZAEI, H. H.; MIRZAJANZADEH, M.; SHAFAROU DI, S. M.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

TANG, D. Y. Y.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; TAO, Y.; HO, S. H.; SHOW, P. L. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. **Bioresource Technology**, v. 304, p.122997. 2020.

TAPARIA, T.; MVSS, M.; MEHROTRA, R.; SHUKLA, P.; MEHROTRA, S. Developments and challenges in biodiesel production from microalgae: A review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 715-726, 2016.

TORRES, S.; ACIEN, G.; GARCÍA-CUADRA, F.; NAVIA, R. Direct transesterification of microalgae biomass and biodiesel refining with vacuum distillation. **Algal Research**, v. 28, p.30-38. 2017.

TRIPATHI, R.; GUPTA, A.; THAKUR, I. S. An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus* sp. ISTGA1. **Renewable Energy**, v. 135, p. 617–625, 2019.

ULUDAMAR, E. Effect of hydroxy and hydrogen gas addition on diesel engine fuelled with microalgae biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 38, p. 18028–18036, 2018.

VALADEZ-CARMONA, L.; ORTIZ-MORENO, A.; CEBALLOS-REYES, G.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 131, p. 99–105, 2018.

VAMVUKA, D.; SFAKIOTAKIS, S.; PANTELAKI, O. Evaluation of gaseous and solid products from the pyrolysis of waste biomass blends for energetic and environmental applications. **Fuel**, v. 236, p. 574–582, 2019.

VARELA-BOJÓRQUEZ, N.; VÉLEZ-DE LA ROCHA, R.; ANGULO, M. Á. Production of bioethanol from biomass of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 2, p. 110-116, 2016.

VERDADE, L. M.; PIÑA, C. I.; ROSALINO, L. M. Biofuels and biodiversity: Challenges and opportunities. **Environmental Development**, v. 15, p. 64–78, 2015.

VIÊGAS, C. V. **EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa* VISANDO À PRODUÇÃO DE ÉSTERES GRAXOS**. 2010. 73 p, Dissertação – Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE, 2010.

VILLANUEVA-BERMEJO, D.; CALVO, M. V.; CASTRO-GÓMEZ, P.; FORNARI, T.; FONTECHA, J. Production of omega 3-rich oils from underutilized chia seeds. Comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods. **Food Research International**, v. 115, p. 400–407, 2019.

WAGNER, J. L.; LEE-LANE, D.; MONAGHAN, M.; SHARIFZADEH, M.; HELLGARDT, K. Recovery of excreted n-butanol from genetically engineered cyanobacteria cultures: Process modelling to quantify energy and economic costs of different separation technologies. **Algal Research**, v. 37, p. 92–102, 2019.

WANG, H.; GAO, L.; CHEN, L.; GUO, F.; LIU, T. Integration process of biodiesel production from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus*. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 39–44, 2013.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from

plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WANG, M.; YUAN, W. Modeling bubble dynamics and radical kinetics in ultrasound induced microalgal cell disruption. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 28, p. 7–14, 2016.

WANG, Y.; GUO, W.; CHENG, C. L.; HO, S. H.; CHANG, J. S.; REN, N. Enhancing bio-butanol production from biomass of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with sequential alkali pretreatment and acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 557–564, 2016.

WANG, Y.; HO, S. H.; CHENG, C. L.; NAGARAJAN, D.; GUO, W. Q.; LIN, C.; LI, S.; REN, N.; CHANG, J. S. Nutrients and COD removal of swine wastewater with an isolated microalgal strain *Neochloris aquatica* CL-M1 accumulating high carbohydrate content used for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 7–14, 2017.

WANG, S.; UZOEJINWA, B. B.; ABOMOHRA, A. E. F.; WANG, Q.; HE, Z.; FENG, Y.; ZHANG, B.; HUI, C. W. Characterization and pyrolysis behavior of the green microalga *Micractinium conductrix* grown in lab-scale tubular photobioreactor using Py-GC/MS and TGA/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 135, p. 340–349, 2018.

WEE, J. S. H.; CHAI, A. B.; HO, J. H. Fabrication of shape memory natural rubber using palmitic acid. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 4, p. 494–501, 2017.

WEI, Y.; ZHANG, T.; XU, G.; ITO, Y. Application of CCC for the separation of lutein from a crude extract of marigold flower petals. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 9-10, p. 1659-1669, 2003.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, V. 4, n.3, p. 287-295. 2010.

WILBANKS, T. J.; FERNANDEZ, S. **Climate change and infrastructure, urban systems, and vulnerabilities: Technical report for the US Department of Energy in support of the national climate assessment**. Island Press, 2014.

WU, X.; MCLAREN, J.; MADL, R.; WANG, D. Biofuels from lignocellulosic biomass.

Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy. p.19–41, 2010.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499–507, 2006.

YANG, B.; CHEN, H.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 314–325, 2015.

YANG, Z.; GUO, R.; XU, X.; FAN, X.; LUO, S. Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 5, p. 3465–3470, 2011.

YE, S.; GAO, L.; ZHAO, J.; AN, M.; WU, H.; LI, M. Simultaneous wastewater treatment and lipid production by *Scenedesmus* sp. HXY2. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122903, 2020.

YODSUWAN, N.; KAMONPATANA, P.; CHISTI, Y.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Ohmic heating pretreatment of algal slurry for production of biodiesel. **Journal of Biotechnology**, v. 267, p. 71–78, 2018.

ZAINAN, N. H.; SRIVATSA, S. C.; LI, F.; BHATTACHARYA, S. Quality of bio-oil from catalytic pyrolysis of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Fuel**, v. 223, p. 12–19, 2018.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGELA, P. **Procedimentos e determinações gerais Métodos Físico-Químicos Para Análise de Alimentos**, Instituto Adolfo Lutz (São Paulo), p. 98, 2008.

ZHANG, R.; PARNIAKOV, O.; GRIMI, N.; LEOVKA, N.; MARCHAL, L.; VOROBIEV, E. Emerging techniques for cell disruption and extraction of valuable bio-molecules of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 2, p. 173–186, 2019.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1376–1384. 2015.

APÊNDICE

Figura A1 - Cromatogramas referentes ao perfil de Ácidos Graxos do extrato em etanol da microalga *M. decolor*, analisada por cromatografia a gás na forma de ésteres metílicos. Imagem 1: cromatograma da área total de picos observados, 2: Expansão do cromatograma na região de 13-19 min.

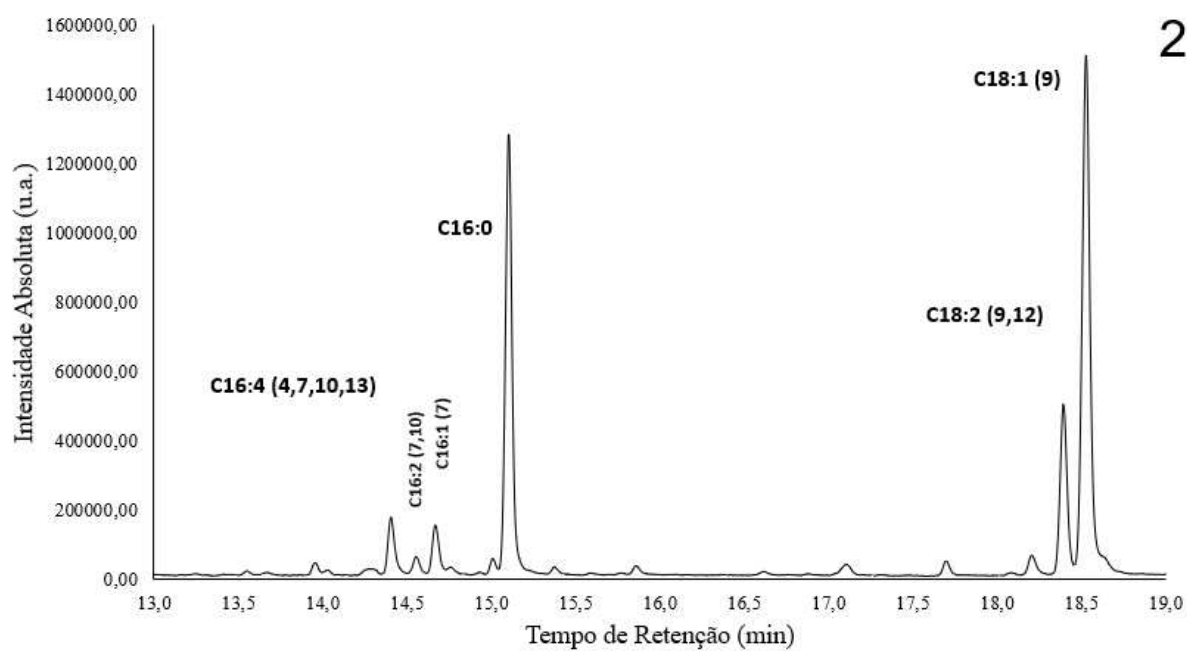
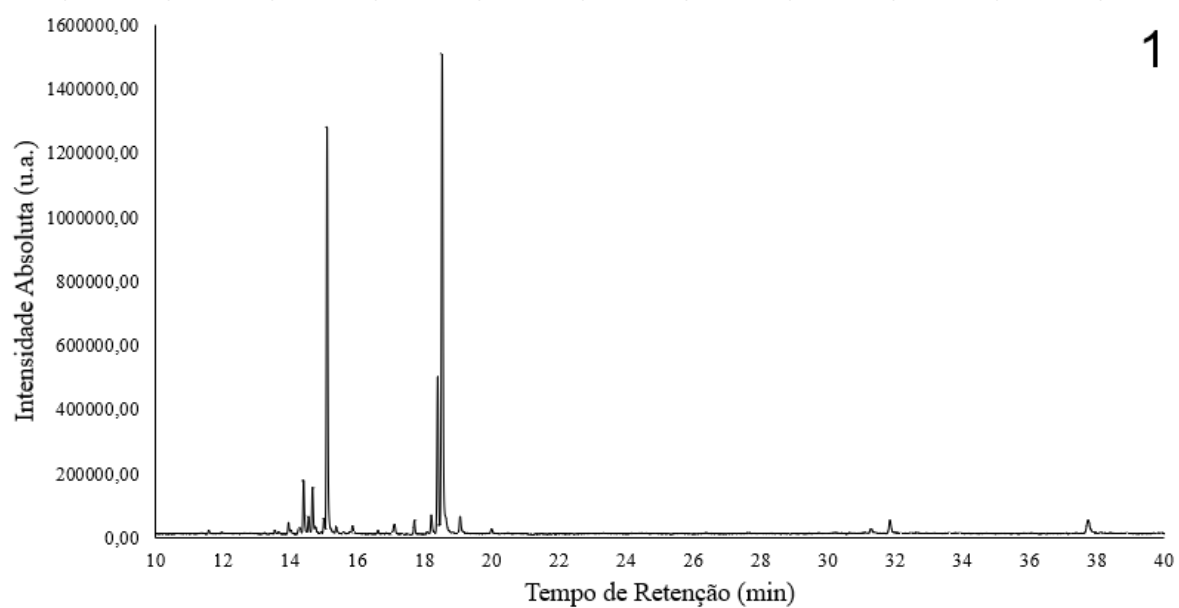


Figura B1 - Cromatogramas referentes ao perfil de Ácidos Graxos do extrato em hexano da microalga *M. decolor*, analisada por cromatografia a gás na forma de ésteres metílicos. Imagem 1: cromatograma da área total de picos observados, 2: Expansão do cromatograma na região de 13-19 min.

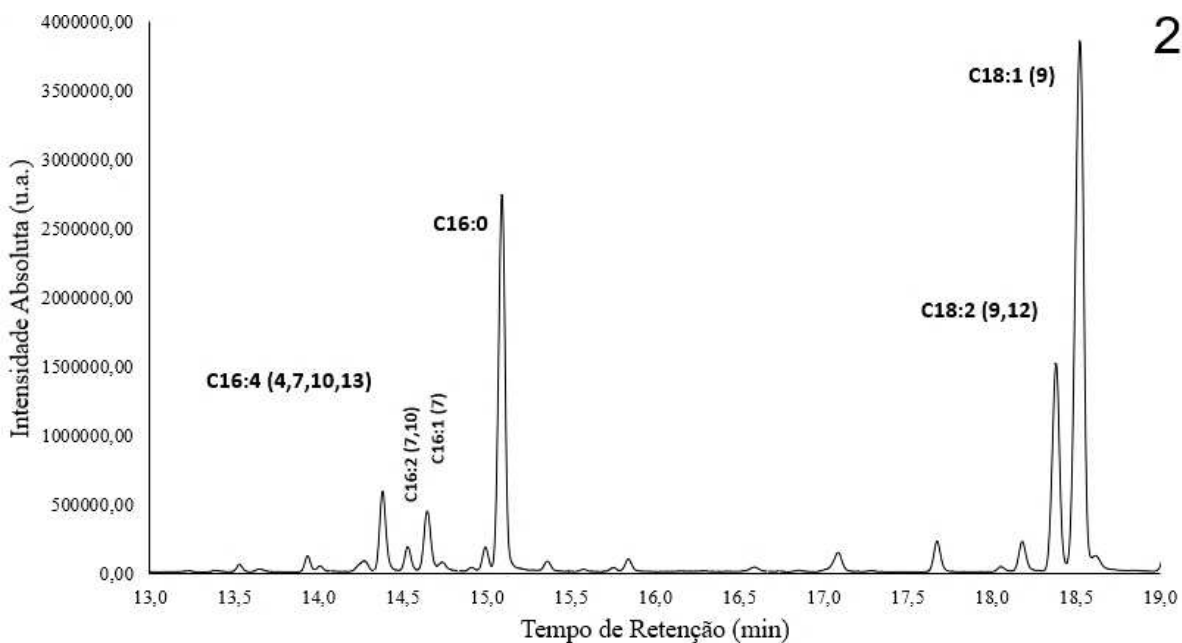
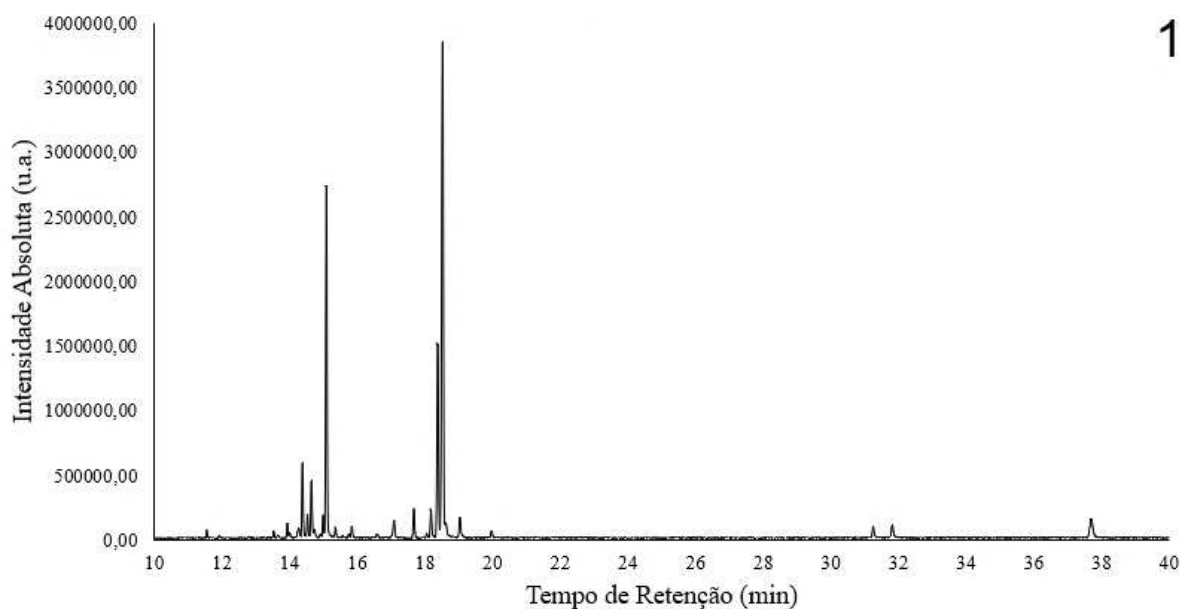


Figura C1 - Cromatogramas referentes ao perfil de Ácidos Graxos do extrato em clorofórmio:metanol (2:1) da microalga *M. decolor*, analisada por cromatografia a gás na forma de ésteres metílicos. Imagem 1: cromatograma da área total de picos observados, 2: Expansão do cromatograma na região de 13-19 min.

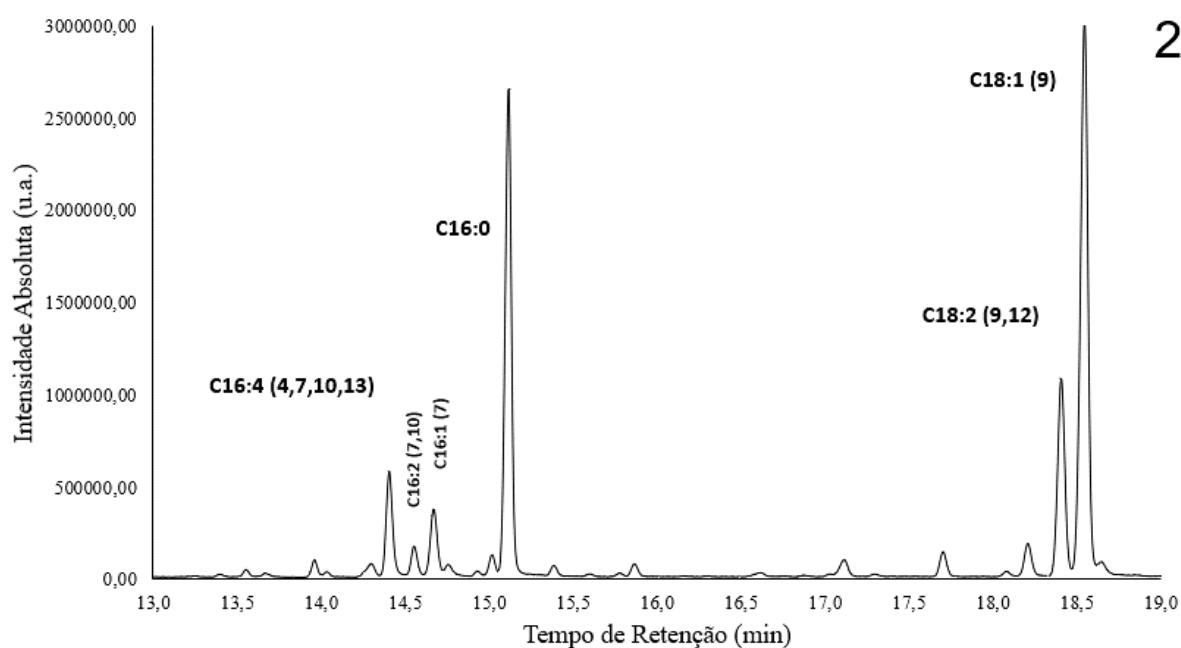
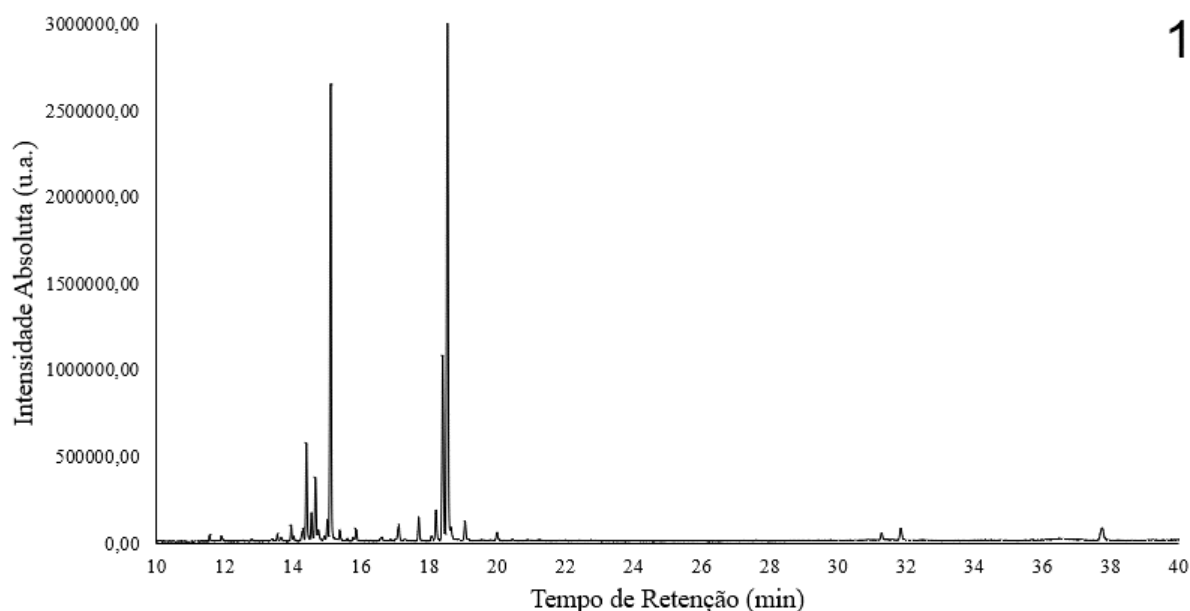


Figura D1 - Cromatogramas referentes ao perfil de Ácidos Graxos do extrato em hexano:etanol (2:1) da microalga *M. decolor*, analisada por cromatografia a gás na forma de ésteres metílicos. Imagem 1: cromatograma da área total de picos observados, 2: Expansão do cromatograma na região de 13-19 min.

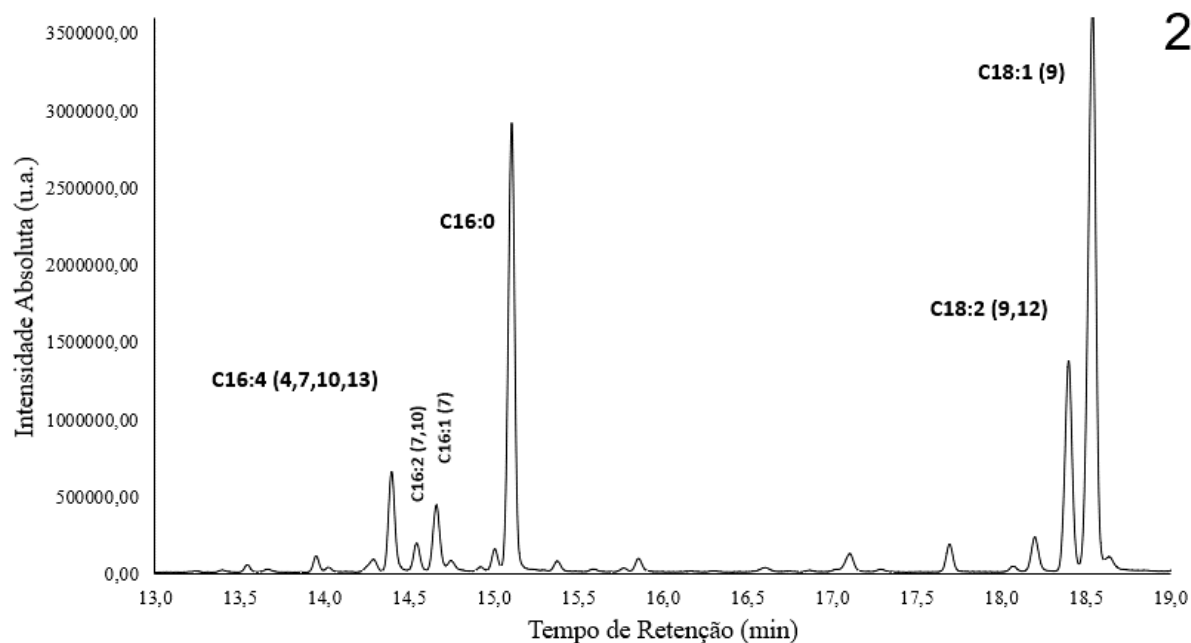
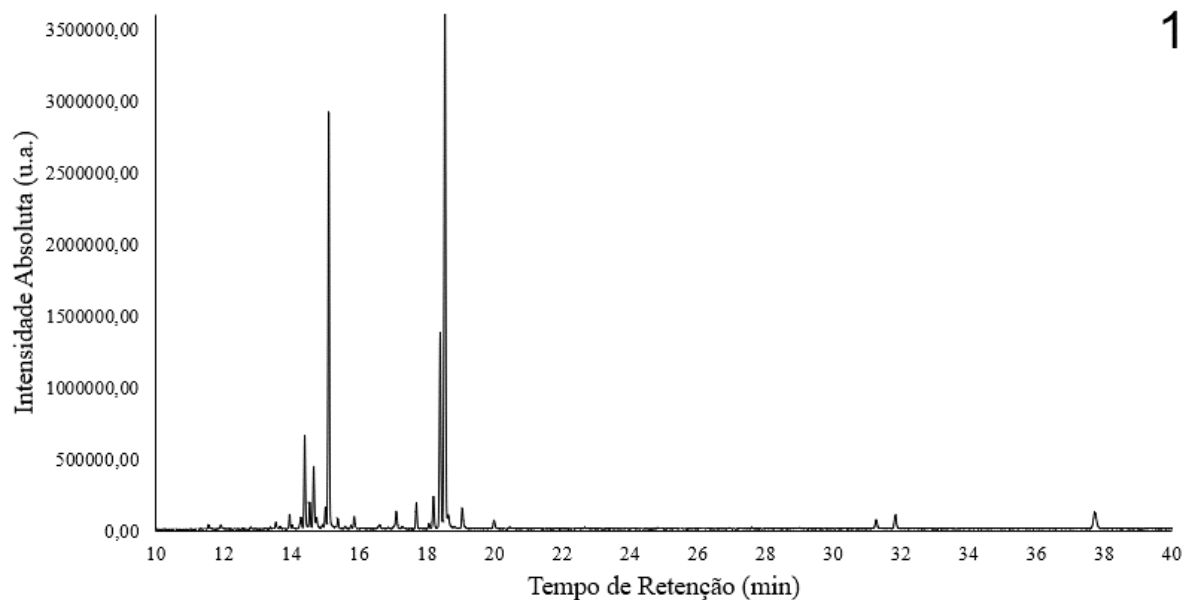


Figura E1 - Cromatogramas referentes ao perfil de Ácidos Graxos do esterificado lipídico (BORGES *et al.*, 2016) da microalga *M. decolor*, analisada por cromatografia a gás na forma de ésteres metílicos. Imagem 1: cromatograma da área total de picos observados, 2: Expansão do cromatograma na região de 13-19 min.

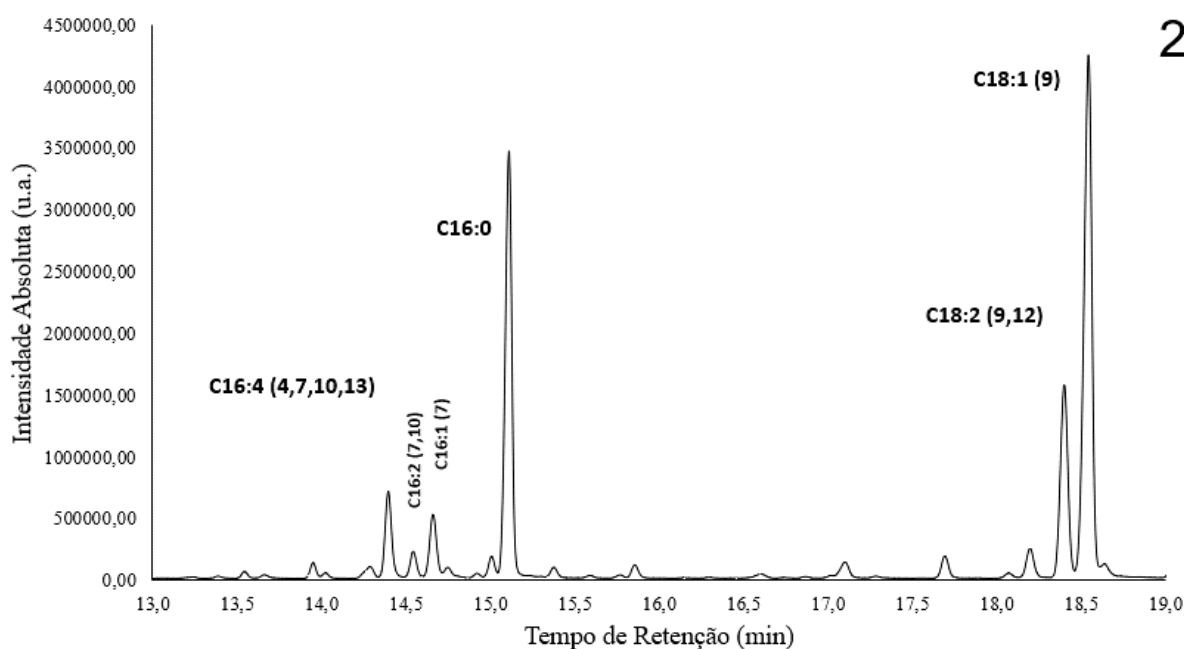
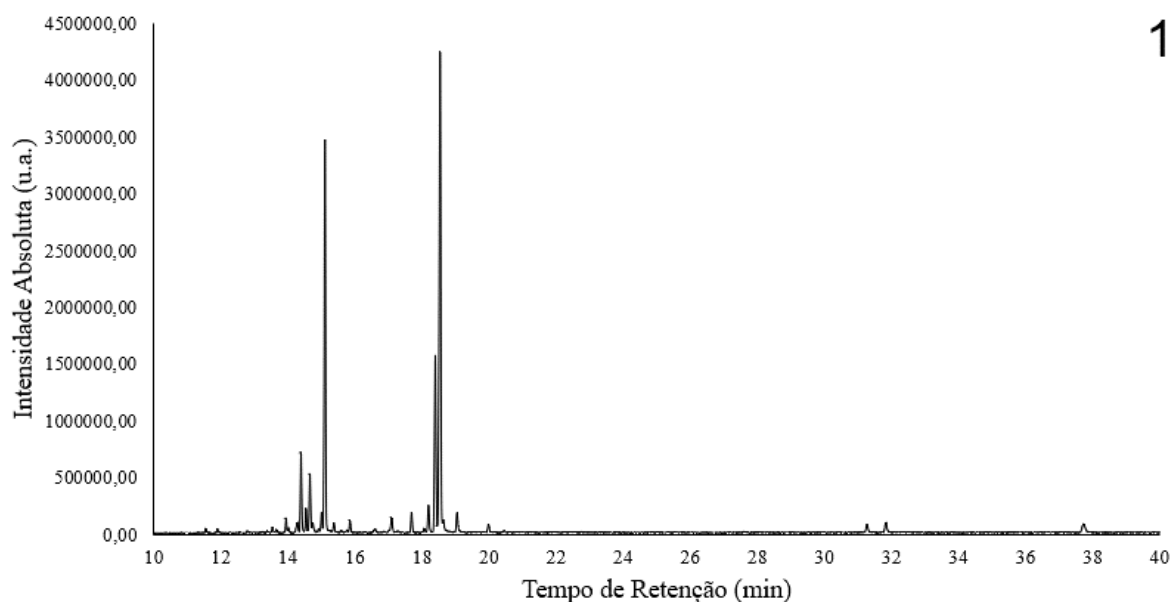


Figura F1 - Cromatogramas referentes ao perfil de Ácidos Graxos do extrato em propano subcrítico da microalga *M. decolor*, analisada por cromatografia a gás na forma de ésteres metílicos. Imagem 1: cromatograma da área total de picos observados, 2: Expansão do cromatograma na região de 13-19 min.

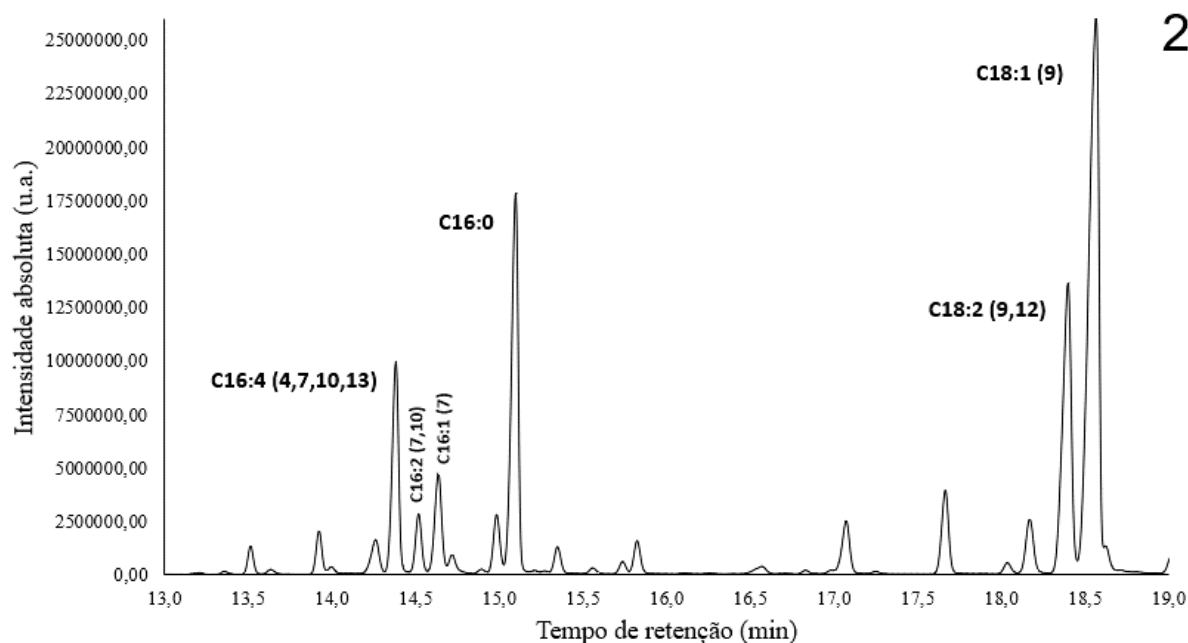
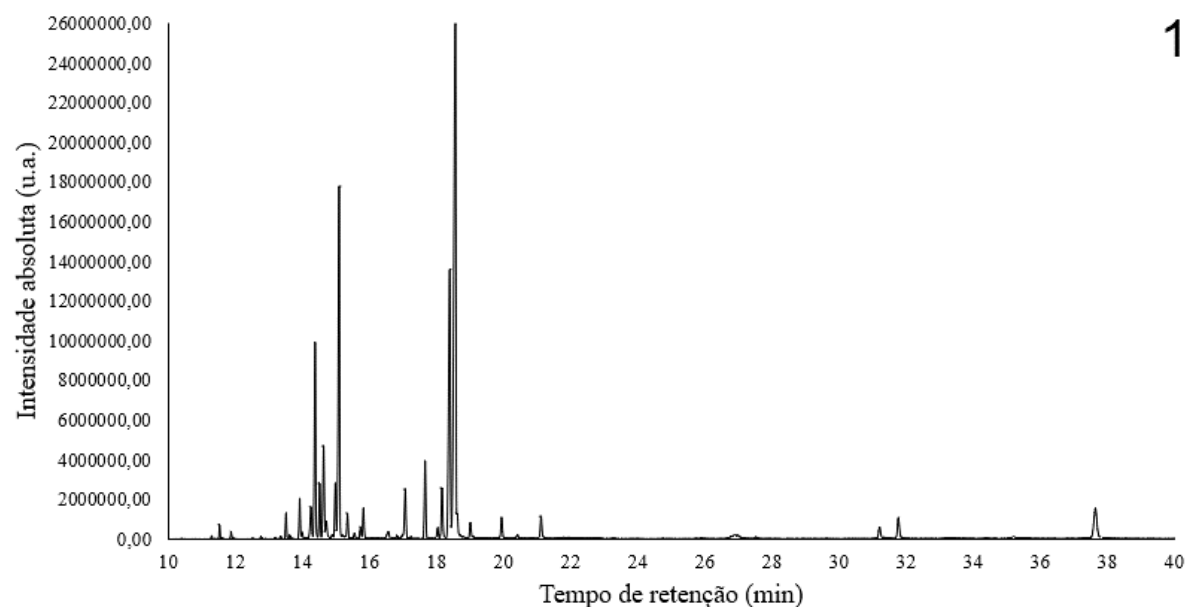


Figura G1 - Cromatogramas referentes ao perfil de Ácidos Graxos do extrato em CO₂ supercrítico da microalga *M. decolor*, analisada por cromatografia a gás na forma de ésteres metílicos. Imagem 1: cromatograma da área total de picos observados, 2: Expansão do cromatograma na região de 13-19 min.

